دانشکده: کشاورزی

گروه: زراعت

پایان نامه

برای دریافت درجه کارشناسی ارشد در رشته بیوتکنولوژی در کشاورزی

عنوان

بررسی نقش مواد مترشحه قارچ *Monosporascus cannonballus* در بیماری پوسیدگی ریشه و زوال بوته‌های خربزه

اساتید راهنما

دکتر ناصر فرخی

دکتر ابوالفضل سرپله

اساتید مشاور

دکتر شاهرخ قرنجیک

دکتر مجتبی ممرآبادی

دانشجو

بهنوش حسینی

بهمن ۹۲

این پایان نامه را در کمال افتخار و امتنان تقدیم می نمایم به آنان که مهر آسمانی شان آرام بخش آلام زمینی ام است:

به استوارترین تکیه گاهم، دستان پر مهر پدرم

به سبزترین نگاه زندگیم، چشمان سبز مادرم

به زیباترین واژه زندگیم، همسر عزیزم حمیدرضا، که نشانه لطف الهی در زندگی من است و سایه مهربانیش سایه سار زندگیم می باشد،

او که اسوه صبر و تحمل بوده و با همیاری و همدلی خود مسیر مشکلات را برایم تسهیل نمود.

پایانش را با نام او آغاز می‌کنم، چرا که آغازش را نیز خود او رقم زده بود.

سپاس بی‌کران پروردگار یکتا را که هستی‌ام بخشید و به طریق علم و دانش رهنمونم ساخت و به هم نشینی رهروان علم و دانش مفتخرم نمود و خوشه‌چینی از علم و معرفت چنان اساتید گرانقدری را روزیم ساخت.

بر خود لازم می‌دانم از تمامی سرورانی که در مراحل پژوهش و نگارش این پایان‌نامه مرا یاری رساندند، تشکر نمایم. سپاس وافر از استادان راهنمای محترم جناب آقای دکتر ناصر فرخی و دکتر ابوالفضل سرپله که با تکیه بر درایت و دانایی علمی بی‌نظیر و نیز کرامات والای اخلاقی ایشان توانستم این مسیر را به مقصد برسانم و از راهنمایی‌های ارزنده‌شان بهرمند شوم.

از استادان مشاور ارجمندم، جناب آقای دکتر شاهرخ قرنجیک و دکتر مجتبی ممرآبادی که در تمام مراحل کارهای تحقیقاتی‌ام همواره از مشاوره‌های موثر ایشان بهره‌مند شدم، بی‌نهایت سپاس‌گزارم.

از جناب آقای دکتر علی درخشان شادمهری و دکتر محمدرضا عامریان، استادان داور محترم این پایان نامه، به پاس نقطه نظرات علمی ارزنده، صمیمانه سپاس‌گزارم.

از اساتید و کارمندان محترم گروه زراعت دانشگاه صنعتی شاهرود به خاطر کمک های بی‌دریغشان قدردانی می کنم.

از اساتید و کارمندان محترم مؤسسه کیاپزشکی کشور بالأخص آقای مهندس قاسمی، خانم دکتر غائب زمهریر، و خانم مهندس چراغعلی به خاطر مشاوره های ارزنده و کمک های بی دریغشان صمیمانه سپاسگزارم.

تنها از عهده تشکر و جبران محبت ها و ایثار پدر و مادر بزرگوار، همسر مهربانم و خواهر عزیزم برنمی آیم که لطفشان را همواره و بی-چشم داشت شار من نمودند و با دلسوزی و محبت به من دلگرمی دادند.

لحظه هایتان همواره سرشار از عشق و کوچه باغ دلهایتان جای پای بهار باد.

بهنوش حسینی- بهمن ماه یک هزار و سیصد و نود و دو

چکیده:

در این تحقیق، مواد مترشحه عامل پوسیدگی ریشه و زوال بوته‌های خربزه *Monosporascus cannonballus* (با وزن مولکولی زیر ۱۰ کیلودالتون (*LMWCs*) و بالای ۱۰ کیلودالتون (*HMWCs*)) با کشت قارچ روی محیط کشت مایع *Czapeck's* استخراج گردیدند و به ترتیب با استفاده از الکتروفورز کاغذی با ولتاژ بالا (*HVPE*) و الکتروفورز ژل سدیم دودسیل سولفات- پلی‌آکریل‌آمید (*SDS-PAGE*) خالص سازی و با کمک *Mass spectrometry* توالی‌های پروتئینی کد کننده‌ی این مواد شناسایی گردید. مواد بالای ۱۰ کیلودالتون روی ژل تشکیل سه باند با وزن‌های مولکولی تقریبی ۲۶، ۲۷ و ۵۷ کیلودالتون را دادند که بر طبق نتایج توالی‌یابی دو باند ۲۶ و ۲۷ کیلودالتونی به دلیل شباهت بسیار آنها از نظر توالی اسید آمینه‌ای، ایزوزیم‌های آنزیم سرین پروتئاز و باند ۵۷ کیلودالتونی به عنوان آنزیم آلفا- مانوزیداز شناخته شدند. آنزیم سرین پروتئاز باعث تجزیه کوتیکول دیواره سلولی میزبان می‌شود ولی تا کنون چگونگی مکانیسم بیماری-زایی آنزیم آلفا- مانوزیداز شناخته نشده است. مواد زیر ۱۰ کیلودالتون در *HVPE* در یک نقطه واکنش مثبت با رنگ ناین‌هیدرین نشان دادند و پس از خالص سازی ماده به دلیل کوچک بودن بیش از حد آن شناسایی صورت نگرفت اما به دلیل واکنش رنگی آن با ناین‌هیدرین، میزان حرکت نسبی آن در کاغذ (R_m = ۱)، فعالیت‌های بیولوژیکی از قبیل آب سوختگی به نظر می‌رسد که این ماده از ماراسمین‌ها (گروهی از ترکیبات فیتوتوکسینی) باشد. همچنین با تزریق این پروتئین‌ها و متابولیت‌ها به برگ‌های خربزه، خاصیت فیتوتوکسینی آنها به اثبات رسید و این اولین گزارش از وجود ترکیبات فیتوتوکسینی جداسازی شده از *M. cannonballus* است که باعث بیماری‌زایی روی گیاهان خربزه می‌شوند. همچنین به منظور دست‌یابی به پایه‌های متحمل خربزه، کشت بافت گیاهان خربزه در محیط‌های کشت *Murashinge and Skoog (MS)* همراه با غلظت‌های متفاوت هورمون‌های *2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D)* و *Benzyl aminopurine (BA)* و غلظت‌های متفاوت سکروتوم قارچی انجام و پس از حدود ۷ هفته مشخص شد که در محیط کشت با *BA* (۰/۱*mg/l*)، *2,4-D* (۵ *mg/l*) و عصاره قارچ ۰/۷ درصد مقدار کالوس‌زایی بیشتر است و می‌توان در این نوع محیط کشت به گیاهان مقاوم به قارچ *M. cannonballus* دست یافت.

واژگان کلیدی: خربزه، پوسیدگی ریشه و زوال بوته‌ها، *Monosporascus cannonballus*، فیتوتوکسین‌های قارچی، کشت بافت خربزه

استخراج و شناسایی توکسین‌های قارچ *Monosporascus cannonballus* عامل پوسیدگی ریشه و زوال خربزه را در دوازدهمین کنگره ژنتیک ایران که از تاریخ ۱ تا ۳ خرداد ماه ۱۳۹۱ در تهران- مرکز همایش‌های بین‌المللی دانشگاه شهید بهشتی برگزار شد، به صورت پوستر ارائه نمودم.

فهرست مطالب

فصل ۱: کلیات

مقدمه ۱

۱-۱- اکولوژی و مشخصات کشاورزی خربزه ۲
۱-۲- بیماری پوسیدگی ریشه و زوال بوته‌های خربزه ۴
۱-۳- تاریخچه و اهمیت بیماری ۴
۱-۴- چرخه زندگی و اپیدمیولوژی *M. cannonballus* ۵
۱-۵- بیولوژی قارچ *M. cannonballus* ۸
۱-۶- مورفولوژی قارچ عامل بیماری ۹
۱-۷- علایم بیماری در خربزه ۹
۱-۸- روش‌های مدیریت بیماری ۱۲
۱-۹- مولکول‌های دخیل در تعامل بین بیمارگر و میزبان ۱۲
۱-۹-۱- فشارهای مکانیکی و شیمیایی بیمارگرها بر بافت‌های گیاهی ۱۴
۱-۹-۲- مکانیسم ایجاد بیماری ۱۵
۱-۹-۲-۱- آنزیم‌ها در بیماری‌های گیاهی ۱۶
۱-۹-۲-۲- فیتوتوکسین‌های میکروبی در بیماری‌های گیاهی ۱۸
۱-۹-۲-۳- تنظیم کننده‌های رشد در بیماری‌های گیاهی ۱۸
۱-۹-۲-۴- پلی‌ساکاریدها ۲۱
۱-۹-۲-۵- سرکوب‌گرهای پاسخ‌های دفاعی گیاهان ۲۲

فصل ۲: مرور منابع

۲-۱- فیتوتوکسین‌ها و نقش آنها در بیماری‌های گیاهی ۲۵
۲-۲- شناسایی گیاه میزبان توسط بیمارگرهای توکسین‌زا ۲۶
۲-۲-۱- فیتوتوکسین‌های اختصاصی میزبان ۲۷
۲-۲-۲- فیتوتوکسین‌های غیراختصاصی میزبان ۳۳
۲-۳- نقش فیتوتوکسین‌ها در بیان علایم و بیماری ۳۳
۲-۴- مکانیسم عمل فیتوتوکسین‌ها ۳۳
۲-۵- بهره‌برداری از فیتوتوکسین‌ها ۳۶

فصل ۳:مواد و روش‌ها

۳-۱- مواد ۳۹
۳-۱-۱- مواد شیمیایی و مواد گیاهی ۳۹
۳-۱-۲- جدایه قارچ ۳۹
۳-۱-۳- محیط کشت‌های اختصاصی قارچ *M. cannonballus* ۳۹
۳-۲- روش بررسی ۴۰
۳-۲-۱- تهیه متابولیت‌های قارچی ۴۰
۳-۲-۲- خالص سازی مقدماتی متابولیت‌های (فیتوتوکسین‌های) قارچی ۴۰

۳-۲-۲-۱ آز مون اثبات بیماری‌زایی سکروتوم در گیاه خربزه..... ۴۲
۳-۲-۲-۲- تأثیر دما روی فعالیت بیولوژیکی سکروتوم..... ۴۲
۳-۲-۲-۳- خالص سازی سکروتوم با استفاده از SDS-PAGE..... ۴۲
۳-۲-۲-۴- شناسایی باندهای پروتئینی..... ۴۳
۳-۲-۲-۵- آزمون اثبات بیماری‌زایی مواد با وزن مولکولی پایین در خربزه..... ۴۳
۳-۲-۲-۶- تأثیر دما روی فعالیت بیولوژیکی مواد با وزن مولکولی پایین..... ۴۴
۳-۲-۲-۷- خالص سازی مواد با وزن مولکولی پایین با استفاده از HVPE..... ۴۴
۳-۲-۲-۸- بررسی اختصاصی و غیراختصاصی بودن مواد فیتوتوکسینی جداسازی شده..... ۴۶
۳-۲-۲-۹- کشت بافت گیاهان به منظور آنالیز تنوع سوماکلونال..... ۴۶

فصل ۴: نتایج
۴-۱- اثبات بیماریزایی سکروتوم (بالای ۱۰ کیلودالتون) در گیاه خربزه..... ۴۹
۴-۲- تأثیر دما روی فعالیت بیولوژیکی سکروتوم قارچ..... ۴۹
۴-۳- جداسازی و شناسایی سکروتوم قارچ (متابولیت‌های پروتئینی)..... ۵۱
۴-۴- اثبات بیماریزایی مواد با وزن مولکولی پائین در گیاه خربزه..... ۵۱
۴-۵- تأثیر دما روی فعالیت بیولوژیکی مواد با وزن مولکولی پائین..... ۵۸
۴-۶- جداسازی مواد با وزن مولکولی پائین (LMWCs)..... ۵۸
۴-۷- اثبات اختصاصی و غیراختصاصی بودن مواد فیتوتوکسینی جداسازی شده..... ۶۱
۴-۸- نتیجه کشت بافت گیاهان به منظور آنالیز تنوع سوماکلونال..... ۶۱
فصل ۵: بحث و پیشنهادات ۶۵

ضمائم
ضمیمه۱- محیط کشت FCM و اجزا آن..... ۷۴
ضمیمه۲- محیط کشت Czapeck's و اجزا آن..... ۷۵
ضمیمه۳- چگونگی غلظت سنجی پروتئین به روش برادفورد..... ۷۶
منابع ۸۰

فهرست اشکال

شکل۱-۱: سطح زیر کشت خربزه در ایران ۳

شکل۱-۲: جایگاه تاکسونومی قارچ *M. cannonballus*.....۷

شکل۱-۳: چرخه زندگی قارچ *M. cannonballus* ۷

شکل۱-۴: پرگنه قارچ روی محیط کشت CMA و PDA ۸

شکل۱-۵: تصاویر میکروسکوپی از قارچ *M. cannonballus* ۱۱

شکل۱-۶: علایم بیماری پوسیدگی ریشه و زوال بوته‌های خربزه باعامل *M. cannonballus* ۱۱

شکل۳-۱: فیلتر کردن و به دست آوردن متابولیت‌های بالا و زیر ۱۰ کیلودالتون ۴۱

شکل۴-۱: بررسی تأثیر سکروتوم بالای ۱۰ کیلودالتون روی برگ‌های حقیقی و کوتیلدونی خربزه ۵۰

شکل۴-۲: بررسی تأثیر سکروتوم بالای ۱۰ کیلودالتون حرارت داده شده..... ۵۰

شکل۴-۳: SDS-PAGE سکروتوم با وزن مولکولی بالاتر از ۱۰ کیلودالتون ۵۲

شکل۴-۴: توالی آنزیم alpha-1,2-mannosidase شناسایی شده در قارچ *M.cannonballus* ۵۳

شکل۴-۵: نتایج Mass spectrometry باندهای ۲۶ و ۲۷ کیلودالتون..... ۵۴

شکل۴-۶: توالی آنزیم serine protease شناسایی شده در قارچ *M. cannonballus*..... ۵۵

شکل۴-۷: دندروگرام فیلوژنی دو آنزیم alpha-1,2-*mannosidase* و serine protease.....۵۶

شکل۴-۸: بررسی تأثیر مواد با وزن مولکولی زیر ۱۰ کیلودالتون روی برگ‌های حقیقی و کوتیلدونی گیاه خربزه.....۵۷

شکل۴-۹: بررسی تأثیر مواد با وزن مولکولی زیر ۱۰ کیلودالتون حرارت داده شده..... ۵۹

شکل۴-۱۰: HVPE مواد با وزن مولکولی زیر ۱۰ کیلودالتون.....۶۰

شکل۴-۱۱ (الف) و (ب): بررسی اختصاصیت و غیراختصاصی بودن میزبانی تأثیر عصاره‌های قارچی با وزن مولکولی زیر ۱۰ کیلودالتون و بالای ۱۰ کیلودالتون ۶۲

شکل۴-۱۲: بررسی تأثیر غلظت‌های متفاوت هورمون‌های BA و 2,4-D و غلظت‌های متفاوت عصاره قارچی بر مقدار کالوس‌زایی ۶۳

فهرست جداول

جدول۱-۱: بیماری‌های مهم خربزه ۳

جدول۱-۲: روش‌های مدیریت بیماری ۱۳

جدول۲-۱: توکسین‌های اختصاصی میزبان ۳۱

جدول۲-۱: توکسین‌های اختصاصی میزبان ۳۲

جدول۲-۲: توکسین‌های غیراختصاصی میزبان ۳۴

جدول۴-۱: آنزیم‌های مشابه به دست آمده از protein blast دو آنزیم آلفا-مانوزیداز و سرین پروتئاز ۵۵

جدول۱: محیط کشت FCM ۷۴

جدول۲: محیط کشت Czapeck's ۷۵

فصل ۱:

کلیات

مقدمه

خربزه[1] از خانواده کدوییان[2] و محصولی با ارزش در بیشتر کشورهای جهان می‌باشد. ناحیه اصلی و منبع اولیه خربزه به شکل کنونی کشور ایران، قفقاز و کشورهای همسایه ایران است. گونه و رقم‌های اهلی خربزه از رقمی وحشی که در ایران نیز موجود است موسوم به *Cucumis trigonus* به وجود آمده است (آمارنامه کشاورزی، ۱۳۸۴).

از نظر وضعیت تولید در جهان طبق آمار فائو کل سطح زیر کشت این محصول در سال ۲۰۰۵ میلادی، ۱،۳۰۸،۰۱۸ هکتار، با عملکرد متوسط ۲۱/۶ تن در هکتار و تولید ۲۸،۳۲۱،۱۵۹ تن می‌باشد که بالاترین تولید متعلق به کشور چین با بیش از ۱۵۱ میلیون تن با متوسط عملکرد ۲۶/۱ تن در هکتار است و ایران با تولید بیش از ۱/۲ میلیون تن از تولیدکنندگان عمده (دارای رتبه سوم جهانی) گیاهان این خانواده و به ویژه خربزه می‌باشد (آمارنامه کشاورزی، ۱۳۸۴). خربزه گیاهی حساس به بیماری‌های گوناگون است و یکی از بیماری‌های بسیار مهم این محصول، پوسیدگی ریشه و زوال بوته-ها است که عامل آن قارچ *Monosporascus cannonballus* می‌باشد که معمولاً ۱ تا ۲ هفته مانده به برداشت محصول ظاهر شده و خسارت زیادی بعضاً تا ۱۰۰ درصد به وجود می‌آورد (توماس و همکاران، ۱۹۹۶).

از آن‌جایی که کنترل شیمیایی در این بیماری رضایت بخش نبوده است و استفاده از طیف وسیعی از قارچ‌کش‌ها و مواد شیمیایی پایدار منجر به آلودگی آب، خاک و بروز مقاومت به عوامل بیماری‌زا می-شود، و به لحاظ خسارت رو به افزایش بیماری‌ها به محصولات زراعی و سعی در کاهش میزان استفاده از سموم شیمیایی، انتخاب ژنوتیپ‌های مقاوم از اصلی‌ترین اهداف اصلاح کنندگان گیاهان طی چندین سال گذشته بوده است. استفاده از روش‌های نوین اصلاح نباتات مولکولی به عنوان ابزاری برای اصلاح و انتخاب گیاهان مقاوم به بیماری فرصت مناسبی را فراهم می‌سازد تا با استفاده از تنوع ژنتیکی ایجاد

1 - *Cucumis melo*
2 - *Cucurbitaceae*

شده در اثر تغییرات سوماکلونی و نیز بهره‌گیری از مهندسی ژنتیک و گزینش درون شیشه‌ای بتوان رقم‌های گیاهی را به سرعت گزینش و تولید نمود که در مقابل پاره‌ای از بیماری‌ها مقاوم باشند.

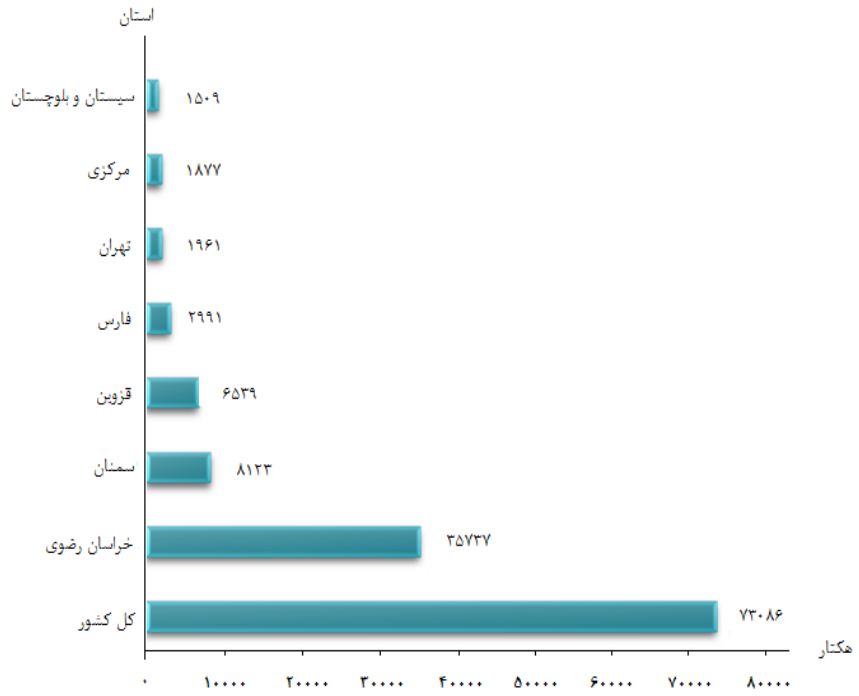
فیتوتوکسین‌ها گروهی از مواد مؤثر در فرآیند بیماری‌زایی هستند که با توجه به فعالیت بیولوژیکی آنها و نقششان در توسعه بیماری، اخیراً از این مواد به عنوان کاوشگری مناسب برای تشخیص سریع کلون‌های مقاوم گیاهان و یا نسل‌های حاصل از تلاقی گیاهان مقاوم با سایر گیاهان استفاده شده است.

در این بررسی، هدف اصلی تحقیق استخراج و شناسایی برخی فرآورده‌های نهایی ژن‌های دخیل در بیماری‌زایی مانند فیتوتوکسین‌های قارچ *Monosporascus cannonballus* می‌باشد. با شناسایی ژن-های کد کننده فیتوتوکسین‌ها و کلون کردن آنها می‌توان خصوصیات آنها را مورد ارزیابی قرار داد و در مطالعات مولکولی پایه استفاده کرد. در حقیقت اگر همان ژن یا ژن‌هایی که تولید توکسین را کنترل می‌کنند، با بیماری‌زایی بیمارگر و شدت علایم ایجاد شده در گیاه مرتبط باشند، می‌توان نقش معنی-دار فیتوتوکسین‌ها را در بیماری‌زایی حتمی دانست.

۱-۱- اکولوژی و مشخصات گیاه شناسی خربزه

خربزه به لحاظ نیازهای دمایی و نوری بالا معمولاً در مناطق گرم و نیمه خشک ایران کشت می-شود (شکل۱-۱) و عمده مراحل رشدی آن در ماه‌های گرم تابستان می‌باشد (پوستچی، ۱۳۵۰). خربزه و طالبی بهترین نتیجه را در آب و هوای گرم و خشک می‌دهند و در این اقلیم‌هاست که طعم آنها شیرین شده و محصول عطری دلپذیر خواهد یافت.

در شرایط آب و هوایی گرم و مرطوب گیاه رشد و نمو بهتری می‌کند ولی میوه آن مرغوب و مطبوع نخواهد شد و گیاه بیشتر مورد حمله امراض قارچی قرار می‌گیرد. خربزه، گیاهی حساس به بیماری‌های گوناگون است که می‌تواند از زمان کاشت تا برداشت مورد حمله عوامل بیماری‌زای مختلف قرار گیرد (جدول۱-۱). این گیاه بر روی تمام خاک‌ها پرورش می‌یابد. ولی بهترین خاک شنی



شکل۱-۱: سطح زیر کشت خربزه در ایران (آمارنامه سال ۱۳۸۸)

جدول ۱-۱: بیماری‌های مهم خربزه (توماس و همکاران، ۱۹۹۶)

نوع بیمارگر	بیماری	نام علمی بیمارگر	میزان خسارت
قارچ			
	سفیدک کرکی	*Pseudoperonospora cubensis*	بسیار بالا
	سفیدک سطحی	*Sphaerotheca fuliginea*	بسیار بالا
	پوسیدگی ریشه و زوال بوته	*Monosporascus cannonballus*	بسیار بالا
	سوختگی ساقه	*Didymella bryoniae*	متوسط
	اسکب	*Cladosporium cucumerinum*	متوسط
	بوته‌میری فایتوفتورایی	*Phytophthora drechsleri*	متوسط
	پژمردگی فوزاریومی	*Fusarium oxysporum* f.sp. *melonis*	متوسط
باکتری			
	پژمردگی باکتریایی	*Erwinia tracheiphila*	بالا
	لکه زاویه‌ای برگ	*Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans*	متوسط
	لکه برگی باکتریایی	*Xanthomonas campestris* pv. *cucurbitae*	متوسط
ویروس			
	ویروس موزائیک کدوئیان	Cucumber Mosaic Virus	بالا
	ویروس زردی کدوئیان	Cucurbit Aphid-Borne Yellow Virus	بالا

یا لوم سیلتی است. هر چه مواد معدنی خاک مثل پتاسیم و فسفر بیشتر باشد، مزه طالبی و خربزه شیرین‌تر می‌شود. بذر خربزه عموماً در درجه حرارت ۱۲ تا ۱۵ درجه سلسیوس شروع به جوانه زنی می‌کند و مناسب‌ترین درجه حرارت برای رشد رویشی خربزه ۳۵-۲۵ درجه سلسیوس می‌باشد و فاصله بین زمان کاشت و اولین برداشت حدود ۱۱۰-۸۰ روز است. مناسب‌ترین اسیدیته برای کاشت خربزه بین ۶ تا ۷ می‌باشد. در خاک‌های اسیدی رشد آن کاهش یافته و برگ‌ها به رنگ زرد مایل به سبز در می‌آیند (مبلی و پیراسته، ۱۳۷۲).

۱-۲- بیماری پوسیدگی ریشه و زوال بوته‌های خربزه

عامل بیماری پوسیدگی ریشه و زوال بوته‌های خربزه قارچ *M. cannonballus* می‌باشد که متعلق به شاخه آسکومایست‌ها است (شکل۱-۲). این بیمارگر به طور معمول در شرایط گرم و خشک و به ویژه در سال‌های کم آب به صورت همه‌گیر در مزرعه ظاهر و ۱-۲ هفته مانده به برداشت محصول باعث مرگ بوته‌ها می‌شود (مارتین و میلر، ۱۹۹۶؛ هولمز و استَنگلینی، ۱۹۹۸؛ کوهن و همکاران، ۲۰۰۰). در گیاهان جوان ممکن است آلودگی وجود داشته باشد ولی تا زمانی که گیاهان بالغ نشده‌اند و میوه‌ها ایجاد نشده باشند علایم مشخصه بیماری ظاهر نمی‌شوند. در اثر ایجاد این بیماری درصد زیادی از میوه‌ها غیر قابل عرضه به بازار می‌شوند، چرا که اندازه آنها کوچک و شیرینی آنها کم و آفتاب سوخته می‌شوند (مرتِلی، ۱۹۹۱). علایم نکروزه در ریشه‌ها ظاهر می‌شوند و به تدریج به رنگ قهوه‌ای مایل به قرمز در می‌آیند و در شرایط حاد دانه‌های سیاه رنگ پریتسیوم بر روی ریشه‌ها نمایان می‌شوند (مارتین و میلر، ۱۹۹۶).

۱-۳- تاریخچه و اهمیت بیماری

بیماری پوسیدگی ریشه و زوال بوته‌های خربزه برای نخستین بار از ایالت آریزونا توسط تروتمن و ماتجکا (۱۹۷۰) گزارش شد. از آن زمان به بعد، این بیماری در نقاط مختلف جهان شناسایی شد و تحت عناوین مرگ خربزه (رونی و همکاران، ۱۹۸۳ و گارسیا- جیمنز و همکاران، ۱۹۹۴)، پژمردگی

ناگهانی (ایال و کوهن، ۱۹۸۶؛ کوهن و همکاران، ۱۹۹۶؛ پیونیا و همکاران، ۱۹۹۷ و ادلستین و همکاران، ۱۹۹۹)، پوسیدگی ریشه (کیم و همکاران، ۱۹۹۵)، زوال بوته (بروتن و میلر، ۱۹۹۷)، پوسیدگی ریشه و زوال بوته (مِرتلی و همکاران، ۱۹۹۱؛ مارتین و همکاران، ۱۹۹۴ و ولف و میلر، ۱۹۹۸) معرفی گردید. در حال حاضر این بیماری از بسیاری از مناطق گرم و نیمه خشک جهان مانند ژاپن (واتاناب و همکاران، ۱۹۷۹ و اُماتسو و همکاران، ۱۹۸۵)، جنوب‌غربی آمریکا (مرتِلی و همکاران، ۱۹۹۱ و ۱۹۹۳)، جنوب اسپانیا (گارسیا-جیمنِز و همکاران، ۱۹۹۴)، تونس (مارتین و همکاران، ۱۹۹۴)، تایوان (تسای و تانگ، ۱۹۹۵)، هندوستان (مارتین و میلر،۱۹۹۶)، عربستان سعودی (کارلاتی و همکاران، ۱۹۹۷) و آمریکای مرکزی (بروتن و میلر، ۱۹۹۷) گزارش شده است. در ایران این بیماری اولین بار از روی بوته‌های طالبی و خربزه از مناطق گرمسار و ایوانکی گزارش شد (سرپله و سنبل کار، ۱۳۸۱). میزبان‌های این بیماری خربزه، طالبی، خیار و هندوانه می‌باشند. درحال حاضر شواهدی دال بر همه‌گیری این عامل در بروز بوته‌میری‌های آخر فصل خربزه و طالبی در مناطق گرم و نیمه خشک ایران و یا زراعت‌هایی با مالچ پلاستیک وجود دارد که باعث خسارت زیاد به صیفی‌کاران و در نتیجه در بسیاری از نقاط، باعث کاهش شدید کشت این محصول شده است (سرپله، ۲۰۱۲ و ۲۰۰۸). به عنوان مثال در منطقه ایوانکی و گرمسار که از مناطق بومی کشت خربزه در ایران می‌باشند بروز گسترده بوته‌میری پایان فصل بر اثر *M. cannonballus* باعث کاهش شدید سطح زیر کشت شده است.

۱-۴- چرخه زندگی و اپیدمیولوژی *M. cannonballus*

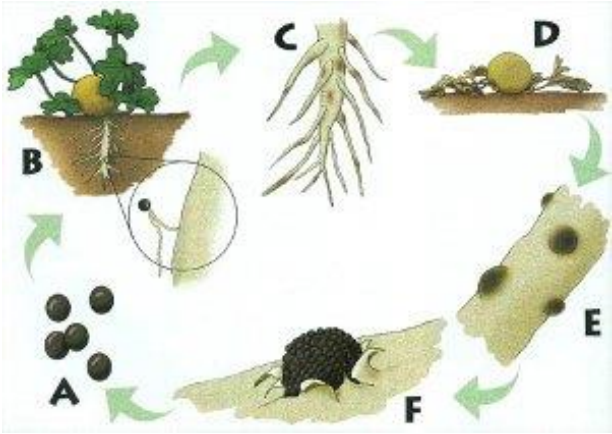
چرخه زندگی قارچ *M. cannonballs* در شکل ۱-۳ آورده شده است. آسکوسپورها از پریتسیوم رها می‌شوند، پس از قرار گرفتن در مجاورت ریشه‌های جوان بوته‌های خربزه جوانه می‌زنند و در لایه بیرونی[1] و گاهی لایه‌های اول و دوم اپیدرم ریشه نفوذ می‌کنند (A) و باعث بروز لکه‌های نکروز و قهوه‌ای روی ریشه می‌شود (B). علایم بیماری در بخش‌های هوایی به صورت کلروز و نکروز برگ‌های

1 - cortex

نزدیک به طوقه ظاهر می‌گردد که به سمت برگ‌های بالایی بوته پیش می‌رود و گیاه را درست ۱ تا ۲ هفته قبل از برداشت محصول از پا در می‌آورد (C). در این مرحله ممکن است پریتسیوم‌ها روی ریشه تشکیل (D) و پس از بلوغ آنها (E)، آسکوسپورها مجدداً رها شده و در خاک تا دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد زنده باقی بمانند (F) (مارتین، ۲۰۰۲) که احتمالاً در بروز آلودگی در کشت‌های بعدی نقش دارند.

آسکوسپورها می‌توانند در بقایای گیاهی آلوده و یا در خاک، بدون وجود میزبان در حالت کمون تا فصل بعدی کشت باقی بمانند ولی این‌که تا چه مدت میسلیوم‌ها در خاک باقی می‌مانند، مشخص نیست. این بیماری توسط روش‌هایی که بتوانند خاک یا بقایای گیاهان آلوده را به جای دیگر منتقل کنند سرایت می‌کند (باد، سیل، فرسایش، کشت و...). هیچ مدرکی در مورد انتقال این بیماری از طریق بذر یا به طور سیستمیک وجود ندارد. این بیماری ریشه‌ها را آلوده می‌کند و میوه‌ها به طور مستقیم آلوده نمی‌شوند (مارتین و میلر، ۱۹۹۶). دمای بهینه برای رشد و بیماری‌زایی این قارچ بین ۳۸–۲۵ درجه سلسیوس می‌باشد که برای جوانه‌زنی آسکوسپورها مناسب می‌باشد (بروتُن و همکاران، ۲۰۰۰). استَنگلینی و همکاران (۱۹۹۶) مشاهده کردند که آسکوسپورها هم به صورت افقی و هم به صورت عمودی در خاک مزارع آلوده انتشار می‌یابند. هر آسکوسپور از طریق بیش از ۳ لوله تندش در ریشه میزبان نفوذ و منجر به بروز حالت فرورفته روی ریشه می‌شود. نتایج این تحقیقات نقش آسکوسپورها را به عنوان اینوکولوم اولیه تأیید کرد.

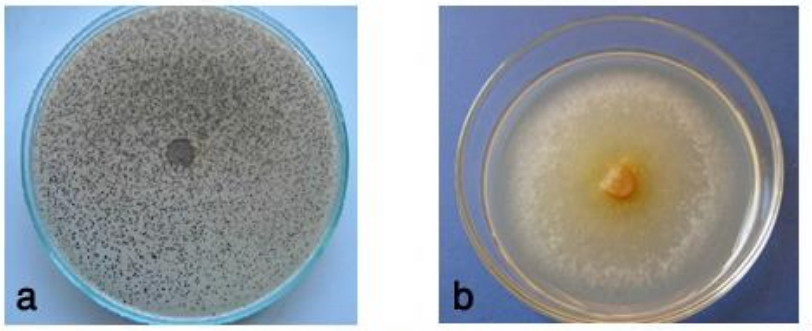
شکل۱-۲: جایگاه تاکسونومی قارچ *Monosporascus cannonballus* (پولاک و اکر، ۱۹۷۴)



شکل۱-۳: چرخه زندگی قارچ *Monosporascus cannonballs*. A: آسکوسپورهای بالغ در خاک. B: آسکوسپورهای جوانه زده و چسبیده به ریشه. C: نواحی نکروزه شده در ریشه. D: پژمردگی و زوال بوته. E: پریتسیوم‌های روی ریشه های آلوده. F: پریتسیوم‌های بالغ و آماده برای خارج شدن آسکوسپور (کوهن و همکاران، ۲۰۰۰).

۱-۵- بیولوژی قارچ *M. cannonballus*

این بیماری با ایجاد آسکوسپورها خود را در داخل خاک تثبیت می‌کند. این آسکوسپورها خیلی قوی هستند و در حقیقت اسپورهایی با چند دیواره می‌باشند که به شدت در مقابل خشکی مقاوم هستند. جوانه زدن آنها در داخل آزمایشگاه به ندرت اتفاق می‌افتد. درجه حرارت مناسب برای رشد رویشی این قارچ در آزمایشگاه بین ۳۵-۲۵ درجه سلسیوس می‌باشد. میسلیوم قارچ در pH = ۹-۵ رشد می‌کند ولی شرایط بهینه بین pH = ۷-۶ است و شرایط اسیدیته چهار به پایین مانع رشد می‌شود. این قارچ در خاک‌های قلیایی و نمکی ملایم سازگاری بهتری دارد. محیط‌های کشت مناسب برای رشد این قارچ PDA[1] (شکل ۱-۴، a) و CMA[2] (شکل ۱-۴، b) می‌باشند. پریتسیوم این قارچ بین ۲- ۳ هفته ظاهر می‌شود. پریتسیوم‌ها به صورت دانه‌های سیاه رنگ روی آنها ظاهر می‌شوند. در بعضی شرایط کلنی‌ها با ایجاد رنگدانه‌هائی به رنگ زرد تا نارنجی یا قهوه‌ای تیره دیده می‌شوند (کوهن و همکاران، ۲۰۰۰).



شکل۱-۴: پرگنه قارچ *M. cannonballus* در محیط کشت CMA حاوی پریتسیوم‌ها (a) و محیط کشت PDA بعد از گذشت ۱۴ روز در دمای ۳۸ - ۲۴ درجه سانتی‌گراد (b) (حسینی، ۱۳۹۰).

1 - potato dextrose agar

2 - corn meal agar

۱-۶- مورفولوژی قارچ عامل بیماری

در شرایط آزمایشگاهی این قارچ در دمای ۳۸ - ۲۵ درجه سلسیوس در محیط کشت رشد می‌کند و بعد از ۳۰ روز روی محیط CMA پریتسیوم‌ها ظاهر می‌شوند. پریتسیوم‌ها تقریباً کروی با دیواره صاف و بدون زائده و به ابعاد از ۳۵۰ × ۳۴۰ تا ۵۲۰ × ۵۰۰ میکرومتر می‌باشند و به رنگ کرم تا قهوه‌ای روشن که با دیواره‌ای تیره پوشانده شده‌اند (پولاک و اُکِر، ۱۹۷۴). آسک‌ها چماقی (گرزی) دارای پایه کوتاه، جداره‌ی ضخیم و به ابعاد ۹۳ × ۴۶ میکرومتر می‌باشند و یک آسکوسپور و به ندرت دو آسکوسپور داخل آسک می‌باشد. آسکوسپورها تقریباً ۷ ساعت بعد از آزاد شدن آسک‌ها از پریتسیوم آزاد می‌شوند (پولاک و اُکِر، ۱۹۷۴). آسکوسپورها تک سلولی و چند هسته‌ای می‌باشند. اگر چه تا ۱۶ هسته هم ممکن است داشته باشند ولی عموماً ۸ هسته دارند (مارتین، ۲۰۰۲) و رنگ آسکوسپورها طی مراحل بلوغ از بی‌رنگ تا قهوه‌ای تیره تغییر می‌کند (سرپله و سنبل‌کار، ۱۳۸۱).

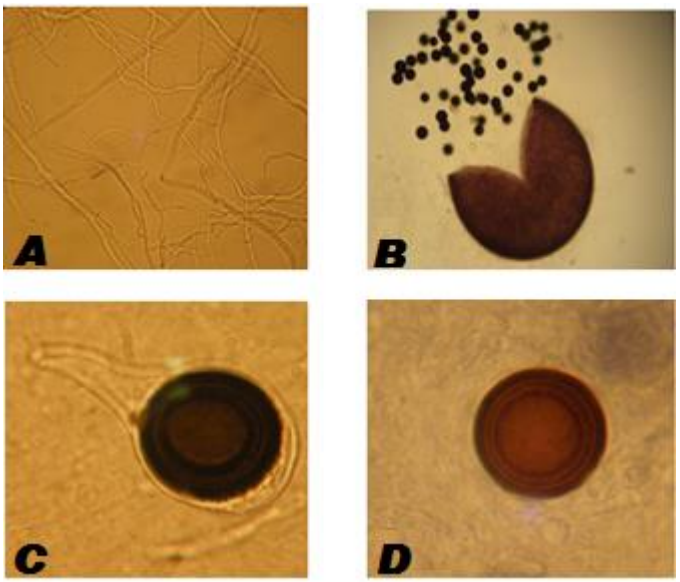
آسکوسپورها دو دیواره دارند (شکل ۱-۵، D). در مورد این قارچ، تاکنون هیچ اسپور غیرجنسی شناخته نشده است. دو گونه از جنس Monosporascus موسوم به *M. cannonballus* و *eutypoides M.* باعث بیماری در خانواده کدوئیان می‌شوند که بر اساس تعداد آسکوسپورها در هر آسک و به سهولت جوانه زدن و یا جوانه نزدن آن متمایز می‌شوند. مطالعات بر اساس بررسی‌های مولکولی (توالی‌های اجزای DNA)، خصوصیات فنوتیپی و بیماری‌زایی آنها نشان داده‌اند که این دو گونه تفاوتی ندارند و طبق آخرین رده‌بندی هر دو به عنوان *M. cannonballus* شناخته شده‌اند (مارتین و میلر، ۱۹۹۶).

۱-۷- علایم بیماری در خربزه

علایم به صورت زردی برگ‌های نزدیک به طوقه ظاهر که این زردی به سمت نوک بوته پیشرفت می‌کند. برگ‌ها سپس نکروزه و در صورت بالا بودن دما و استرس خشکی، تمام تاج گیاه ظرف مدت کوتاهی از بین می‌رود. مرگ گیاه، آن هم درست قبل از برداشت سبب نرسیدن کامل میوه می‌شود و

میزان قند این میوه‌ها پایین و سطح بالایی میوه‌ها به دلیل قرار گرفتن در معرض آفتاب، سوخته و فاقد کیفیت لازم می‌باشد (مارتین و میلر، ۱۹۹۶). چنین مزارعی معمولاً فاقد سودآوری اقتصادی بوده و رها می‌گردند. ریشه‌های آلوده دارای علایم پوسیدگی و لکه‌های نکروزه یا زخم‌های قهوه‌ای رنگ بوده و در قیاس با بوته‌های سالم از انشعابات و رشد کمتری برخوردار هستند (شکل۱-۶). علایم این بیماری تشابه زیادی به علایم توصیف شده در عارضه عقب سفید (بیماری فیزیولوژیک) (شریف و همکاران، ۱۳۴۶ و پوستچی، ۱۳۵۰) دارد. هر چند به نظر می‌رسد این قارچ از مدت‌ها قبل نیز در خاک‌های ایران وجود داشته است ولی به لحاظ مجموعه‌ای از فاکتورها نظیر تشابه علایم ناشی از *M. cannonballus* با عوامل معمول بوته‌میری نظیر گونه‌های پیتیوم و *Fusarium solani* (گارسیا-جیمنز و همکاران، ۱۹۹۴؛ بروتن و همکاران، ۱۹۹۵؛ آلفارو و همکاران، ۱۹۹۶ و آگرتر و همکاران، ۲۰۰۰)، و از طرف دیگر تولید اندام‌های باردهی این قارچ تحت شرایط خاص، مانع از شناسایی این قارچ به عنوان عامل بوته میری پایان فصل خربزه و طالبی گردید. قارچ مذکور در مرحله رویشی صرفاً تولید هیف‌های قارچی می‌کند و اندام‌های باردهی غیرجنسی ندارد و بنابراین در این مرحله از رشد قابل تشخیص نیست. همچنین تولید مثل جنسی (آسکوسپورها) *M. cannonballus* که تنها راه تشخیص این قارچ می‌باشد، تحت شرایط محیطی خاص مانند دماهای بالاتر از ۳۹ درجه سانتی‌گراد و بعضی از محیط کشت‌ها مانند CMA تشکیل می‌شود. علاوه بر اینها، شرایط خاص اثبات بیماری‌زایی *M. cannonballus* (مارتین و میلر، ۱۹۹۶) احتمالاً مانع تحقق بیماری‌زایی آن در شرایط آزمایشگاه شده است. به نظر می‌رسد که مجموعه این علل در عدم معرفی گونه *M. cannonballus* به عنوان عامل بوته میری‌های پایان فصل طالبی و خربزه در ایران مؤثر بوده‌اند.

استفاده از ارقام مقاوم در کنترل و کاهش خسارت بسیاری از بیمارگرهای گیاهی یک اصل می‌باشد که تاکنون هیچ رقم مقاوم با کیفیت زراعی قابل قبولی برای کاهش خسارت *M. cannonballus* گزارش نشده است (کوهن و همکاران، ۱۹۹۶). تحقیق حاضر در نظر دارد عاملیت *M. cannonballus*



شکل۱-۵: تصاویر میکروسکوپی از قارچ *Monosporascus cannonballus* A) میسیلیوم B) پریتسیوم، که بعد از ۳۰ روز روی محیط CMA ظاهر می‌شود C) آسک حاوی یک آسکوسپور D) آسکوسپور با دیواره چند لایه (مارتین، ۲۰۰۲).

شکل۱-۶: علایم بیماری پوسیدگی ریشه و زوال بوته‌های خربزه با عامل *Monosporascus cannonballus* شامل a) زردی عمومی در برگ‌ها b) نکروز کامل بوته و رها شدن مزرعه c و d) زخم‌ها و لکه‌های نکروز روی ریشه و کاهش انشعابات آن (چراغعلی، ۱۳۸۹).

در بروز عارضه پوسیدگی ریشه و زوال بوته خربزه و طالبی را با استفاده از جداسازی، تخلیص و شناسایی متابولیت‌ها (فیتوتوکسین‌ها) مورد آزمایش قرار دهد تا بتوان در آینده با استفاده از مهندسی ژنتیک ژن‌های بیماری‌زایی را به گیاه وارد کرد و رقم مقاوم را به دست آورد.

۱-۸- روش‌های مدیریت بیماری

کنترل این بیماری خیلی مشکل می‌باشد به طوری‌که تاکنون هیچ روش مؤثر طولانی مدت و کارآمد برای آن پیشنهاد نشده است. بررسی این بیماری در مزرعه مونوسیکل بودن این بیماری را تأیید می‌کند (واوق و همکاران، ۲۰۰۳). برای بیمارگرهای مونوسیکل اغلب روش‌های مختلفی به کار گرفته می‌شود که جمعیت بیمارگر را کاهش دهد. می‌توان با ضد عفونی کردن خاک از تکثیر منابع آلودگی (ریشه‌های آلوده) در مزرعه بعد از برداشت محصول جلوگیری کرد. به طور کلی ضدعفونی خاک، استفاده از قارچ‌کش‌ها و استفاده از آنتاگونیست‌ها از روش‌های به کار رفته برای به حداقل رساندن گسترش و شیوع بیماری ناشی از *M. cannonballus* می‌باشند (جدول۱-۲). در ادامه به شرح مولکول‌های دخیل در تعامل بین بیمارگر و میزبان و شناسایی آنها می‌پردازیم.

۱-۹- عوامل دخیل در تعامل بین بیمارگر و میزبان

گیاهان سالم و آسیب ندیده، اجتماع عظیمی از سلول‌ها هستند و این سلول‌های گیاه از دیواره سلولی، غشاهای سلولی، سیتوپلاسم حاوی هسته و اندامک‌های مختلف تشکیل شده‌اند. بیمارگرها به این دلیل که در طول دوران تکامل خود، این توانایی را به دست آورده‌اند که از مواد ساخته شده به وسیله گیاه میزبان استفاده کنند، به گیاهان حمله‌ور می‌شوند. بسیاری از این مواد در داخل پروتوپلاسم سلول‌های گیاهی قرار دارند و تنها در صورتی این مواد مورد استفاده قرار می‌گیرند که بیمارگرها بتوانند از سدهای موجود بر سطح گیاهان مانند کوتیکول و دیواره سلولی عبور کرده و به پروتوپلاسم برسند. حتی پس از گذشتن از دیواره سلول‌های خارجی، پیشروی بیمارگر، باز مستلزم رخنه به دیواره سلول‌های دیگر است. به علاوه، گیاه نیز در برابر بیمارگر و فعالیت آن واکنش نشان

جدول۱-۲: روش‌های مدیریت قارچ *M. cannonballus*

روش کنترل	میزان مقاومت	توضیحات	مرجع
کشنده زیستی			
- متیل بروماید	بالا	ضدعفونی خاک با متیل بروماید قبل از کشت	یوکو و همکاران، ۱۹۹۲و کلین، ۱۹۹۶
قارچ کش			
- کرسوکسیم متیل	بسیار بالا	مانع رشد رویشی قارچ می‌شود.	کوهن و همکاران، ۱۹۹۹
- فلوآزینام	بسیار بالا	باقی‌مانده سموم در میوه‌ها بالاست.	پیونیا و همکاران، ۲۰۱۰
آفتاب دهی خاک	غیر مؤثر	نیاز به مبارزه تلفیقی با متیل بروماید، متام سدیم و دازومت دارد.	کوهن، ۲۰۰۰
کنترل بیولوژیک			
- تریکودرما	بالا	متصل شدن به قارچ و ترشح آنزیم‌های تجزیه کننده دیواره سلولی و متلاشی کردن قارچ	کوپک و همکاران، ۲۰۰۱-هاول، ۲۰۰۳و وو و همکاران، ۲۰۰۶
ارقام مقاوم ژنتیکی		هدف برنامه‌های اصلاحی	کوهن و همکاران، ۲۰۰۰

داده تولید مواد شیمیایی و موانع ساختمانی می‌کند که مزاحم پیشروی و حتی ادامه حیات بیمارگر می‌گردد. لذا بیمارگر تنها در صورتی می‌تواند از مواد سلول استفاده کند و به حیات خود ادامه دهد که بتواند همه این موانع را از میان بردارد. بنابراین یک بیمارگر برای این‌که بتواند در گیاه تولید آلودگی کند باید بتواند به درون گیاه راه یابد و ضمن تأمین مواد غذایی مورد نیاز خود واکنش‌های دفاعی گیاه را نیز خنثی کند. بیمارگرها این عملیات را عمدتاً با ترشح مواد شیمیایی اثر گذار بر بعضی از اجزای ساختمانی و متابولیسم میزبان به انجام می‌رسانند (آگریوس، ۲۰۰۵).

۱-۹-۱- فشارهای مکانیکی و شیمیایی بیمارگرها بر بافت‌های گیاهی

بیمارگرهای گیاهی عموماً موجودات بسیار ریزی هستند که قادر به ایجاد نیروی کافی برای نفوذ بر سطح گیاه نیستند. تنها برخی از قارچ‌ها، گیاهان عالی انگل و پاره‌ای از نماتدها می‌توانند با ایجاد فشار بر سطح گیاه به آن رخنه کنند. این فشار متفاوت بوده و به میزان نرم شدن قبلی سطح گیاه بر اثر تراوش‌های آنزیمی بیمارگر بستگی دارد. قارچ‌ها و گیاهان عالی انگل برای ورود به گیاه نخست بایستی به آن بچسبند. اگرچه در اطراف ریسه قارچ مقداری مواد چسبناک (Fungal adhesives) وجود دارد که معمولاً گلیکوپروتئین‌های غیرقابل حل در آب همراه با لیپیدها و پلی‌ساکاریدها هستند، اما چنین به نظر می‌رسد که چسبندگی این‌ها به گیاه بیشتر مربوط به نیروهای بین مولکولی است که بین سطح گیاه و بیمارگر به سبب تماس نزدیک حاصل می‌شود. در بعضی موارد هنگام تماس هاگ با یک سطح مرطوب یک لایه چسبناک بر سطح هاگ تولید و ترشح آنزیم‌های کوتیناز و سلولاز از سطح هاگ، به چسبیدن آن به سطح گیاه کمک می‌کند. هاگ بعضی قارچ‌ها در قسمت نوک حاوی مواد چسبنده‌ای هستند که به علت جذب آب باعث چسبیدن اسپور به سطوح مختلف می‌شوند. پس از تماس بیمارگر با گیاه قطر ریسه قارچ در محل تماس افزایش می‌یابد و اندام مسطح و حباب مانندی که چنگگ[1] نامیده می‌شود به وجود می‌آید. این عضو باعث وسعت سطح تماس بین دو موجود گشته

1 - appressorium

و بیمارگر را محکم به میزبان می‌چسباند. از وسط چنگگ اندام ظریف و باریکی که میخ رخنه[1] نامیده می‌شود شروع به رشد کرده و کوتیکول و دیواره سلولی را سوراخ و از آن عبور می‌کند و در داخل سلول‌های اپیدرمی رشد و تولید هوستوریوم[2] می‌کند که بتواند مواد غذایی را جذب کند و از طرف دیگر بعضی مواد خاص را که مربوط به بیماری‌زایی قارچ هستند را به داخل سلول‌های گیاهی ترشح کند. در برخی از قارچ‌ها مانند: Alternaria، Cochilobolus، Colletotrichum، Magnaporthe، Verticillium و Gaeumannomyces، رخنه قارچ به درون سلول گیاه تنها در صورتی انجام می‌پذیرد که ماده رنگین ملانین در دیواره سلولی چنگگ انباشته شود. به نظر می‌رسد که ملانین با ایجاد یک لایه ساختمانی سخت و حبس مواد در چنگگ، سبب جذب آب شده و فشار تورژسانس درون چنگگ زیاد می‌شود که به رخنه فیزیکی میخ رخنه به درون گیاه کمک می‌کند (یودر و تورگون، ۱۹۹۴). رخنه قارچ‌ها و عبور از موانع مختلف تقریباً در تمام موارد با کمک مواد آنزیمی تراوش شده قارچی در محل رخنه و در نتیجه نرم شدن سطح گیاه تسهیل می‌گردد. پس از ورود به سلول، قارچ مقدار بیشتری مواد آنزیمی ترشح می‌کند که احتمالاً دیواره سلولی مقابل را نرم یا حل کرده و پیشروی را آسان می‌سازد.

۱-۹-۲- مکانیسم ایجاد بیماری

گرچه برخی بیمارگرها ممکن است از نیروی فشار برای رخنه به درون بافت‌های گیاهی استفاده کنند ولی فعالیت آنها در گیاه بیشتر جنبه شیمیایی دارد. لذا اثراتی که بیمارگرها بر و درون گیاه به وجود می‌آورند، تقریباً همگی نتیجه کنش و واکنش‌های بیوشیمیایی است که بین مواد موجود یا تولید شده در گیاه صورت می‌گیرد (آگریوس، ۲۰۰۵).

آنزیم‌های تخریب کننده دیواره و مواد داخل سلول‌های گیاهی، فیتوتوکسین‌ها، مواد تنظیم کننده رشد، پلی‌ساکاریدها (مواد مسدود کننده آوندها) ازگروه‌های اصلی مواد شیمیایی مترشحه بیمارگرها

1 - penetration peg
2 - haustorium

هستند که به طور مستقیم یا غیرمستقیم در ایجاد و گسترش بیماری دخالت دارند. این مواد از نظر اهمیتی که در بیماری‌زایی دارند با هم تفاوت داشته و اهمیت نسبی آنها ممکن است از یک بیماری تا بیماری دیگر یکسان نباشد. به طور مثال در بعضی از بیماری‌های پوسیدگی نرم، آنزیم‌ها به مراتب اهمیت بیشتری دارند در حالی‌که در بیماری‌هایی مانند گال طوقه، مواد کنترل کننده رشد ظاهراً مهمترین مواد دخیل در بیماری هستند (زو و همکاران، ۲۰۰۰) و در بیماری بلایت ناشی از Bipolaris در یولاف رقم ویکتوریا بیماری نتیجه فیتوتوکسین‌هایی است که بیمارگر ترشح می‌کند (سوگاوارا و همکاران، ۱۹۸۵). آنزیم‌ها، فیتوتوکسین‌ها و مواد کنترل کننده رشد به ترتیب ذکر شده اهمیتی بیشتر از پلی‌ساکاریدها در بیماری‌زایی داشته و مرسوم‌تر هستند. بیمارگرها این آنزیم‌ها و مواد را یا در ضمن فعالیت‌های نهادی[1] خود تولید می‌کنند یا ضمن رشد بر روی بستره مشخصی (از قبیل گیاه میزبان) که در آن صورت القایی[2] نامیده می‌شوند. به طور کلی، آنزیم‌های بیمارگرهای گیاهی اجزای ساختمانی سلول‌های میزبان خود را متلاشی می‌کنند، مواد غذایی درون سلول‌ها را تجزیه و یا مستقیماً بر روی پروتوپلاست و اجزای غشاهای درون سلول اثر گذاشته و در عملکرد آنها ایجاد اختلال می‌کنند. فیتوتوکسین‌ها به طور مستقیم بر روی پروتوپلاست و اجزای غشاهای درون سلول اثر گذاشته و در نفوذپذیری و عمل غشاها ایجاد اختلال می‌کنند. مواد کنترل کننده رشد بر روی سلول‌ها اثر هورمونی داشته و باعث افزایش یا کاهش قدرت تکثیر سلول یا بزرگ شدن آن می‌شوند. پلی‌ساکاریدها به ظاهر فقط در بیماری‌های آوندی نقش داشته و به طور غیرمستقیم در انتقال آب در گیاه اختلال ایجاد می‌کنند.

۱-۹-۲-۱- آنزیم‌ها در بیماری‌های گیاهی

آنزیم‌ها مولکول‌های پروتئینی بزرگی هستند که به شکل کاتالیزور در تمام واکنش‌های وابسته به هم داخل یک سلول زنده نقش دارند. هر نوع واکنش شیمیایی که در هر سلول رخ می‌دهد، توسط

1 - constitutively
2 - inducible

یک آنزیم خاص تسهیل و یا کاتالیز می‌شود. بنابراین به تعداد واکنش‌های شیمیایی که در درون سلول اتفاق می‌افتد آنزیم وجود دارد (کولاتوکودی، ۱۹۸۵). این آنزیم‌ها در تجزیه مواد دیواره سلولی و همچنین مواد درون سلول نقش دارند. اولین تماس بیمارگرها با میزبانشان معمولاً در سطح گیاه رخ می‌دهد. سطح قسمت‌های هوایی گیاه عمدتاً از کوتیکول و یا سلولز تشکیل شده در حالی‌که سطح دیواره سلولی ریشه‌ها را تنها سلولز تشکیل می‌دهد. کوتیکول که از کیتین تشکیل شده، اغلب با لایه-ای از موم نیز پوشانده شده است. بخش زیرین کیتین با تیغه‌های پکتینی و سلولزی آمیخته شده است. باز هم پایین‌تر لایه‌ای عمدتاً متشکل از مواد پکتینی است و در زیر آن یک لایه سلولز قرار دارد و آنزیم‌هایی مانند کوتیناز، پکتیناز و سلولازها برای تجزیه آنها وجود دارند. آن دسته از قارچ‌ها که مستقیماً به کوتیکول رخنه می‌کنند همیشه مقداری کوتیناز ترشح می‌کنند که بر روی کیتین اثر می‌گذارد (کین، ۱۹۹۵). پکتینازها توسط اسپورهای در حال جوانه‌زنی تولید شده و ظاهراً با سایر متابولیت‌های بیمارگر (مثل کوتینازها و سلولازها) در امر نفوذ و رخنه به داخل میزبان همکاری می-کنند. سلولازها رخنه و پیشروی بیمارگر را در داخل گیاه تسهیل و با تجزیه و در هم ریختگی ساختمان سلولی به ایجاد بیماری کمک می‌کنند.

بیشتر انواع بیمارگرها تمام یا بخشی از دوره زندگی خود را در داخل یا در ارتباط با پروتوپلاست زنده می‌گذارند. این بیمارگرها بی‌تردید مواد غذایی را از پروتوپلاست می‌گیرند. بیمارگرهای دیگر یعنی قسمت اعظم قارچ‌ها و باکتری‌ها مواد غذایی را از پروتوپلاست مرده به دست می‌آورند. بعضی از مواد غذایی مانند قندها و اسیدهای آمینه به قدر کافی کوچک هستند که مستقیماً جذب بیمارگرها شوند. پاره‌ای دیگر از مواد تشکیل دهنده سلول از قبیل پروتئین‌ها، نشاسته و چربی‌ها فقط هنگامی می‌توانند مورد استفاده واقع شوند که توسط آنزیم‌های مترشحه پروتئینازها، آمیلازها و لیپازها تجزیه شده باشند.

۱-۹-۲-۲- فیتوتوکسین‌های میکروبی در بیماری‌های گیاهی

سلول‌های زنده گیاهی سامانه‌های پیچیده‌ای هستند که واکنش‌های بی‌شمار بیوشیمیایی وابسته به یکدیگر به طور همزمان یا به ترتیب معین شده از قبل در آنها رخ می‌دهد. اختلال در هر یک از این واکنش‌ها باعث مختل شدن و یا انحراف متابولیسم عادی گیاه شده و به تولید بیماری منجر می‌گردد. از میان عواملی که می‌توانند چنین اختلالاتی تولید کنند مواد سمی مترشحه به وسیله بیمارگرها که توکسین خوانده می‌شوند را می‌توان نام برد. فیتوتوکسین‌ها متابولیت‌های ثانویه تولید شده توسط میکروارگانیسم‌های بیمارگر گیاهی هستند که نقش مهمی در توسعه بیماری گیاهی دارند و ماهیت شیمیایی این متابولیت‌ها از ترکیبات با وزن مولکولی پایین که شامل محصولات طبیعی مانند ترپن‌ها، کرومانون‌ها، بوتنولیدها، پیرون‌ها، ماکرولیدها، ترکیبات حلقوی و آمینواسیدها تا ترکیبات با وزن مولکولی بالا مانند پروتئین‌ها، گلیکوپروتئین‌ها و پلی‌ساکاریدها هستند (تورنر، ۱۹۸۴). فیتوتوکسین‌ها با اثر بر روی نفوذپذیری غشاء سلول یا با خنثی کردن آنزیم‌ها و در نتیجه اختلال در فعل و انفعالات آنزیمی مربوط به سلول‌ها به گیاه آسیب می‌رسانند. برخی از فیتوتوکسین‌ها مانند سموم عمومی پروتوپلاسم عمل کرده و بر روی گیاهان از تیره‌های مختلف اثر می‌گذارند (والتون، ۱۹۹۶). بعضی دیگر فقط بر روی گونه‌ها و ارقام به خصوصی سمی بوده و برای سایر گیاهان کاملاً بی‌زیان هستند (اوسبورن، ۲۰۰۱).

۱-۹-۲-۳- تنظیم کننده‌های رشد در بیماری‌های گیاهی

رشد گیاهان به وسیله تعداد معدودی از مواد طبیعی که عمل هورمون‌ها را انجام می‌دهند به عنوان مواد تنظیم کننده رشد، تنظیم می‌شود. اکسین‌ها، جیبرلین‌ها و سیتوکینین‌ها مواد تنظیم کننده رشد مهمی هستند اما مواد دیگری همچون اتیلن و مواد ممانعت کننده رشد مانند سالسیلیک اسید و جاسمونیک اسید نیز نقش مهمی در زندگی گیاهان دارند. به نظر می‌رسد در مواردی مواد کنترل کننده رشد باعث افزایش ساخته شدن مولکول‌های mRNA و تولید آنزیم‌های ویژه‌ای می‌شوند که به نوبه خود فیزیولوژی و بیوشیمی گیاه را تنظیم می‌کنند. اکسین ماده‌ای است که پیوسته در

بافت‌های جوان و در حال رشد تولید می‌شود و به سرعت به طرف بافت‌های مسن در حرکت است. اما همواره توسط یک آنزیم اکسید کننده به نام ایندول استیک اسید اکسیداز خنثی می‌شود و به همین دلیل غلظت آن بسیار پایین است. اثرات این هورمون در گیاه بسیار متنوع است. این هورمون برای طویل شدن و تبدیل و تمایز سلول‌ها ضروری است، جذب آن به وسیله غشاء سلولی باعث تغییر در نفوذپذیری غشاء می‌شود، سبب افزایش عمومی سرعت تنفس بافت‌های گیاه شده و سنتز mRNA و در نتیجه تولید پروتئین‌ها اعم از آنزیم‌ها و پروتئین‌های ساختمانی را تسریع می‌کند. در بعضی بیماری‌ها تمام یا قسمتی از افزایش غلظت IAA مربوط به کاهش انهدام IAA بر اثر متوقف ساختن آنزیم IAA- اکسیداز است که در مورد بیماری‌های سیاهک ذرت و زنگ ساقه گندم به اثبات رسیده است (یامادا، ۱۹۹۳).

جیبرلین‌ها جزو مواد طبیعی موجود در گیاهان سبز بوده و برخی از میکروارگانیسم‌ها هم آنها را ترشح می‌کنند. این هورمون‌ها اثرات بارزی بر افزایش رشد دارند و می‌توانند ارتفاع رقم‌های پاکوتاه را به اندازه رقم‌های عادی برسانند و گلدهی، بلند شدن ساقه و ریشه و رشد میوه را نیز سرعت بخشند. ظاهراً جیبرلین‌ها ژن‌هایی را که قبلاً خاموش شده باشند به حالت فعال در می‌آورند به طور مثال در بیماری گیاهچه گنایی برنج[1]، گیاهچه‌های آلوده به قارچ *Gibberella fujikuroi* به سرعت رشد کرده و بسیار بلندتر از گیاهچه‌های سالم می‌شوند و این افزایش رشد ظاهراً تا حد زیادی به ترشح جیبرلین توسط قارچ مربوط می‌شود.

سیتوکینین‌ها از مواد کنترل کننده رشد بسیار قوی به شمار می‌روند و برای رشد و تمایز سلول‌ها و تشکیل بافت‌ها ضروری هستند. علاوه بر این از تجزیه پروتئین‌ها و نوکلئیک اسیدها جلوگیری کرده و در نتیجه از پیر شدن گیاه ممانعت می‌کنند. همچنین از خاموش شدن ژن‌های فعال جلوگیری می‌کنند و باعث فعال شدن ژن‌های خاموش شده می‌شوند. فعالیت سیتوکینین‌ها در گال‌های ریشه

1 - rice foollish seedling

گرزی، گال‌های طوقه، گال‌های زنگ و سیاهک‌ها افزایش می‌یابد و تصور بر این است که سیتوکینین-ها در بیماری‌هایی به نام جاروک که به وسیله موجودات شبه باکتریایی (مولیکوت‌ها[1]) تولید می‌شوند نیز نقش دارند (اروپزا و همکاران، ۱۹۹۷).

مقاومت القاء شده گیاهان در برابر بیمارگرها، معمولاً توسط شبکه‌هایی از مسیرهای علامت‌دهی مرتبط با هم صورت می‌گیرد که در آنها اجزای اولیه را مولکول‌های علامت دهنده گیاهی اسید سالسیلیک، اسید جاسمونیک، اتیلن و احتمالاً اکسید نیتریک تشکیل می‌دهند (اگریوس، ۲۰۰۵). در بسیاری از واکنش‌های میزبان- بیمارگر، گیاهان با تشدید تولید این مواد در برابر حمله بیمارگر پاسخ داده و هم‌زمان یک دسته از ژن‌های مرتبط با دفاع وابسته به پدیده ژن در برابر ژن[2] (دویت، ۱۹۹۲)، فعال گردیده و تلاش می‌کنند تا آلودگی را متوقف سازند. اسید سالسیلیک با چند پروتئین گیاهی از جمله دو آنزیم اصلی از بین برنده آب اکسیژنه یعنی کاتالاز و آسکوربات پراکسیداز واکنش می‌دهد (دورنر و کلسیگ، ۱۹۹۵). به نظر می‌رسد اجزای اصلی چرخه وابسته به اسید سالسیلیک ایجاد کننده مقاومت به بیماری، ژن‌های نهادی (همیشه بیان شونده) پروتئین‌های مرتبط با بیماری‌زایی (پروتئین-های PR) باشند. بعضی از این ژن‌ها موجب فعال سازی مسیرهای وابسته به جاسمونیک اسید و اتیلن نیز می‌شوند. تولید اسید سالسیلیک در داخل مسیر وابسته به اکسید نیتریک و در پایین دست آن صورت می‌گیرد. اکسید نیتریک نیز مشابه اسید سالسیلیک با اکونیتاز، کاتالاز و آسکوربات پراکسیداز ترکیب شده و از فعالیت آنها بازداری می‌کند (میتلر و همکاران، ۲۰۰۴). عموماً نیازی به اسید سالسیلیک برای فعالیت ژن‌های مقاومت و ایجاد مقاومت در محل آلودگی نیست ولی در بعضی از گیاهان به وجود آن برای استقرار و حفظ مقاومت سیستمیک اکتسابی در محل‌های اولیه آلودگی و نیز در بافت‌های ثانویه دور از محل آلودگی نیاز است. در حال حاضر به نظر می‌رسد واکنش فوق

1 - mollicutes
2 - gene-for-gene

حساسیت با ایفای نقش توأم و تنظیم متقابل واسطه‌های اکسیژن فعال (ROI[1]) و سیگنال‌های وابسته به اسید سالسیلیک رخ می‌دهد (اگریوس، ۲۰۰۵).

اتیلن همچنین باعث افزایش نفوذپذیری غشاهای سلولی می‌شود که معمولی‌ترین پیامد عفونت‌هاست. در بیماری‌های پژمردگی یا بوته‌میری آوندی نیز به اتیلن به عنوان عاملی برای خمیدگی برگ‌ها اشاره شده است (راجندرا و جوناتان، ۲۰۰۹). در بیماری پژمردگی ورتیسیلیومی گوجه‌فرنگی وجود اتیلن در هنگام ایجاد آلودگی مانع از ایجاد و پیشرفت بیماری می‌شود در حالی که پس از استقرار آلودگی اتیلن سبب تشدید پژمردگی می‌گردد (روبی‌سون و همکاران، ۲۰۰۱).

۱-۹-۲-۴- پلی‌ساکاریدها

قارچ‌ها، باکتری‌ها، نماتدها و احتمالاً دیگر بیمارگرهای گیاهی مواد لزجی از خود تراوش می‌کنند که سطح بدن آنها را پوشانده و لایه‌ای به وجود می‌آورد که حایل سطح خارجی موجود زنده با محیط پیرامون آن می‌گردد. در برخی بیمارگرها وجود پلی‌ساکاریدهای سطحی برای ایجاد نشانه‌های معمول بیماری لازم به نظر می‌رسد. مولکول‌های پلی‌ساکارید یا مستقیماً در ایجاد نشانه‌های بیماری نقش دارند یا غیرمستقیم با تشدید کلونیزه کردن و یا افزایش زنده‌مانی بیمارگر سبب تسهیل بیمارگری می‌گردند. ظاهراً نقش پلی‌ساکاریدهای لعاب مانند در بیماری‌های گیاهی به ویژه در پژمردگی‌های آوندی مهم است. در پژمردگی‌های آوندی مولکول‌های بزرگ پلی‌ساکارید که توسط بیمارگر در آوندهای چوبی رها می‌شوند ممکن است برای انسداد مکانیکی دسته‌های آوندی کافی بوده و آغازگر پژمردگی گیاه باشند. اهمیت پلی‌ساکاریدها در بستن راه آوندها در پژمردگی‌های آوندی زمانی بهتر درک می‌شود که بدانیم در نتیجه عملیات آنزیمی بیمارگرها بر روی مواد گیاهی، مولکول‌های درشت دیگری نیز تولید و به درون آوندها رها می‌شوند (اگریوس، ۲۰۰۵).

1 - reactive oxygen intermediates

۱-۹-۲-۵- سرکوب‌گرهای پاسخ‌های دفاعی گیاهان

برخی قارچ‌های بیمارگر مانند *Puccinia graminis* f.sp. *tritici* عامل زنگ ساقه گندم و *Mycosphaerella pinodes* عامل لکه‌برگی نخود فرنگی موادی به نام سرکوب کننده[1] تولید می‌کنند که مانند فاکتورهای بیمارگری عمل کرده و از بیان واکنش‌های دفاعی در گیاه میزبان جلوگیری می‌نمایند. در زنگ ساقه گندم این ماده ممانعت کننده از سیستم‌های دفاعی گیاه در مایع جوانه‌زنی قارچ و در مایع بین سلولی برگ گندم آلوده به زنگ یافت می‌شود. این بازدارنده با غشای پلاسمایی سلول میزبان تعامل کرده و سبب کاهش اتصال محرک گلیکوپروتئین ۶۷ کیلودالتونی دفاعی میزبان به غشای سلولی می‌شود. به این ترتیب مولکول سرکوب‌گر فعالیت آنزیم PAL (فنیل آلانین لیاز) و فرآیند عادی پاسخ دفاعی گیاه را سرکوب می‌کند (مندژن و همکاران، ۲۰۰۰). در مایع جوانه‌زنی اسپور قارچ عامل لکه‌برگی نخود فرنگی دو نوع سرکوب‌گر تولید می‌شود که هر دوی این مواد گلیکوپپتید هستند و مانع از فعالیت محرک[2] بیوسنتز فیتوالکسین گشته و به طور موقت همه واکنش‌های دفاعی گیاه میزبان را متوقف می‌سازند (کاتو و همکاران، ۱۹۹۳).

برای بعضی از بیمارگرها تولید متابولیت یا متابولیت‌ها برای ایجاد بیماری ضروری است، به همین خاطر در این موارد متابولیت نقشی اساسی در تعامل بیمارگر و گیاه ایفا می‌نماید. اگر تحت شرایطی میکروارگانیسم قابلیت سنتز این ترکیبات را به خاطر نداشتن ژن مربوطه (ژن بیماری‌زا) یا از دست دادن آن نداشته باشد، بیماری‌زا نبوده و به عنوان بیمارگر قلمداد نمی‌شود. برای مثال موتانت‌های بعضی از باکتری‌ها مثل *Pseudomonas syringae* subsp. *savastanoi* که دچار نقصان در ژن‌های کدکننده ایندول استیک اسید (IAA) و سیتوکینین می‌شوند، قادر به ایجاد هیپرپلازی بر روی گیاهان میزبان نیستند (سوریکو، ۱۹۹۶). مشابه آن بعضی از موتانت‌های قارچ‌هایی مثل Alternaria، Cochliobolus که دچار نقصان در ژن کدکننده فیتوتوکسین‌های اختصاصی میزبان گردیده‌اند، قادر

1 - suppressors
2 - elicitor

به ایجاد بیماری بر روی ژنوتیپ‌های حساس گونه‌های میزبان نمی‌باشند (سرون و همکاران، ۱۹۹۳). در این شرایط ویرولانس بیمارگر بستگی به مقدار توکسین تولید شده دارد. بعضی دیگر از متابولیت‌ها که اصطلاحاً به آنها تعیین کننده‌های ویرولانس[1] گفته می‌شود، در غیاب بیمارگر تولید کننده آنها، توانایی ایجاد بیماری و حداقل بعضی از علایم بیماری را در گیاهان دارند. در این خصوص می‌توان مثلاً از فوزیکوسین[2] عامل بیماری سیستمیک در هسته‌داران (توسط *Phomopsis amygdali*) نام برد (گرانتی و همکاران، ۱۹۹۵). این فیتوتوکسین غیراختصاصی به جز گیاهان میزبان بر روی سایر گونه گیاهان نیز خسارت وارد می‌سازد (گرانتی، ۱۹۸۹). در این مورد ویرولانس بیمارگر بستگی به نوع و غلظت متابولیت‌های تولید شده دارد، در صورتی که میزان مقاومت ژنوتیپ‌های گیاه میزبان به تحمل-پذیری بافت‌ها به اثرات سمی فیتوتوکسین بیمارگر بستگی دارد (ادوکی و همکاران، ۱۹۹۶).

به نظر بوس و پارلولیت (۱۹۹۵) در رابطه با بیماری‌زایی[3] یک میکروارگانیسم باید فاکتورهای تهاجمی را از ویرولانس بیمارگر تفکیک کرد. منظور از فاکتورهای تهاجمی[4]، توانایی یک میکروارگانیسم در نفوذ، یعنی عبور از موانع دفاعی گیاه میزبان و ایجاد یک رابطه تغذیه‌ای با آن را گویند و ویرولانس[5] به توانایی یک میکروارگانیسم در ایجاد علایم بیماری در گیاه میزبان اطلاق می‌شود.

همان‌طور که اشاره گردید فیتوتوکسین‌ها نیز یکی از فاکتورهای تهاجمی محسوب می‌شوند و بیمارگرها برای این‌که بتوانند بر گیاهان مسلط شوند اقدام به تولید این ترکیبات می‌کنند که برای میزبان سمی هستند یعنی در واقع باعث اختلال در فیزیولوژی گیاه و یا باعث مرگ سلول می‌شوند و در هر دو صورت ضمن صدمه زدن به گیاه زمینه استقرار و توسعه بیماری را در گیاه فراهم می‌کنند. در فصل بعدی به توضیح مفصل راجع به این فاکتورهای تهاجمی می‌پردازیم.

1 - virulence determinants
2 - fusiccocin
3 - pathogenicity
4 - aggressivity factors
5 - virulence

فصل ۲:

مرور منابع

۲-۱- فیتوتوکسین‌ها و نقش آنها در بیماری‌های گیاهی

پس از نفوذ بیمارگر به داخل گیاه میزبان، مرحله بعدی در حمله برای استعمار گیاه، اغلب ترشح فیتوتوکسین‌ها یا ترکیبات شبه هورمونی است که فیزیولوژی گیاه را به نفع بیمارگر تغییر می‌دهند. این تداخل می‌تواند به طور معمول شامل کشتن سلول‌های گیاه به منظور جذب مواد مغذی و یا استفاده از ماشین آلات سلولی باشد که در هر صورت استقرار و توسعه بیماری را در گیاه فراهم می-کنند (کین، ۱۹۸۶). از دیر باز نقش فیتوتوکسین‌ها در بیماری‌زایی در پرده‌ای از ابهام قرار گرفته بود. اگرچه باکتری‌ها و قارچ‌ها قادر به تولید متابولیت‌های خارج سلولی[1] در محیط کشت بوده که علایم معمول بیماری را در گیاهان ایجاد می‌کردند، اما برای سالیان متمادی عدم توانایی در خالص‌سازی و شناسایی این متابولیت‌ها باعث شد که نقش آنها در به وجود آوردن بیماری ناشناخته باقی بماند. مطالعات در مورد نقش فیتوتوکسین‌ها در بیماری‌زایی برای اولین بار توسط گاومان در سال ۱۹۴۰ در سوئیس انجام گرفت. این تحقیقات موجب گسترش مطالعات مشابه در سایر کشورها شد و گروه‌هایی متشکل از پاتولوژیست‌ها و شیمیدان‌ها جهت جداسازی و شناسایی این ترکیبات تلاش فراوانی صورت دادند. امروزه تحقیقات بر روی فیتوتوکسین‌ها به تمام نقاط جهان گسترش یافته و نظر تعداد زیادی از دانشمندان را به خود جلب نموده است. فیتوتوکسین‌ها به غیر از علم بیماری‌شناسی گیاهی، در مطالعات مولکولی پایه‌ای نیز مورد استفاده قرار گرفته‌اند و در این رابطه ابزار مهمی جهت شناخت نحوه عملکرد بسیاری از مواد فعال بیولوژیکی بوده‌اند. با استفاده از فیتوتوکسین‌ها گام‌های بسیار مؤثری در خصوص شناخت جریانات بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی گیاهان از قبیل عملکرد دریافت کننده‌های غشاء سلولی[2]، پمپ یونی[3]، فتوسنتز، تعرق و باز و بسته شدن روزنه‌ها، نر عقیمی ژنتیکی[4]، جذب آب و حمل و نقل مواد غذایی برداشته شده است.

1 - extra- cellular metabolites
2 - membrane receptors
3 - ion pumps
4 - genetic male sterility

تا به امروز هدف اصلی تحقیقات در خصوص قارچ‌های توکسیژنیک و بیماری‌های گیاهی، شناسایی فرآورده‌های نهایی ژن‌های بیماری‌زا، یعنی فیتوتوکسین‌ها بوده است. این ترکیبات از لحاظ بیولوژیکی بسیار فعال هستند و دارای قابلیت انتخابی بالایی بر روی ژنوتیپ اختصاصی مثل فیتوتوکسین‌های انتخابی میزبان می‌باشند (اسچفر و لیوینگستون، ۱۹۸۴). همچنین مطالعات نسبتاً گسترده‌ای بر روی محصولاتی از ژن‌های گیاهی که تعیین کننده مقاومت آنها به قارچ‌ها می‌باشد، صورت گرفته هر چند موفقیت‌های حاصله آنقدرها چشم‌گیر نبوده است.

۲-۲- شناسایی گیاه میزبان توسط بیمارگرهای توکسین‌زا

گیاهان عالی مرتباً در معرض قارچ‌های پارازیت قرار می‌گیرند، اما فقط نسبت به تعداد بسیار کمی از این بیمارگرهای گیاهی حساسیت داشته و توسط آنها بیمار می‌شوند. به صورت معمول بیشتر گیاهان دارای مکانیسم‌های دفاعی غیرمیزبانی بوده و می‌توانند در برابر تمام بیمارگرهای غیرمیزبان از خود دفاع کنند. این گیاهان فقط در برابر تعدادی از پارازیت‌های تخصص یافته توانایی دفاع از خود را ندارند. این ویژگی در پارازیتیسم و یا شناسایی میزبان از دیرباز مورد توجه گیاه‌پزشکان قرار داشته است ولی تاکنون تعریف دقیقی از واژه "شناسایی" در رابطه با میزبان بیمارگر ارائه نگردیده است. سکویرا[1] (۱۹۷۸) در کتابی به نام Challenging Problems in Plant Health مبحث ارزشمندی را تحت عنوان شناسایی و ویژگی بین گیاهان و بیمارگرها مطرح نموده است. در این بخش از کتاب که بعداً به نام تعریف سکویرا معروف شد، شناسایی میزبان به عنوان اولین رویداد اختصاصی در برانگیختن پاسخ آشکار گیاه تلقی شده که در نتیجه باعث ممانعت از رشد بیمارگر توسط گیاه می‌گردد. امروزه در بین محققان دو تئوری مختلف در خصوص ویژگی میزبانی یا شناسایی میزبان توسط بیمارگرها وجود دارد. تحقیقات نشان می‌دهند که از زمان‌های طولانی اغلب دانشمندان بر این باورند که ویژگی میزبان ناشی از فعال شدن مکانیسم‌های مقاومت گیاه می‌باشد. بدین معنی که آزادسازی محرک‌های اختصاصی و غیراختصاصی توسط بیمارگرهای گیاهی، موجب تحریک میزبان به تولید

1 - sequeira

فیتوالکسین و یا واکنش فوق حساسیت می‌گردد. نظریه دوم ویژگی میزبانی را ناشی از واکنش حساسیت گیاه به بیمارگر دانسته که از طریق مهار ویژه ژنوتیپی یا مهار مقاومت القایی میزبان توسط عوامل اختصاصی بیمارگر مثل فیتوتوکسین‌های اختصاصی میزبان[1] (HSTs) و مهار کننده‌های ویژه دیگر اعمال می‌گردد (آگریوس، ۲۰۰۵).

۲-۲-۱- فیتوتوکسین‌های اختصاصی میزبان

این قبیل از فیتوتوکسین‌ها فقط روی گیاهانی که دارای ژنوتیپ حساس به بیمارگر می‌باشند تأثیر می‌گذارند. این گروه از فیتوتوکسین‌ها در غلظت‌های بسیار پائین (غلظت‌های فیزیولوژیکی) قادر به تولید علایمی می‌باشند که کاملاً شبیه به علایم ناشی از آلودگی طبیعی در گیاهان میزبان است. واژه توکسین اختصاصی میزبان توسط پرینگل و اسچفر (۱۹۶۴) معرفی شد. فیتوتوکسین‌های میزبان انتخابی (HSTs) شامل ترکیبات با وزن مولکولی پایین شامل محصولات طبیعی مانند ترپن‌ها، کرومانون‌ها، بوتنولیدها، پیرون‌ها، ماکرولیدها، ترکیبات حلقوی و آمینواسیدها تا ترکیبات با وزن مولکولی بالا مانند پروتئین‌ها و پلی‌ساکاریدها هستند (تورنر، ۱۹۸۴). به نظر نیشمورا و اسچفر (۱۹۶۵)، فیتوتوکسین‌ها در هنگام جوانه زدن بیمارگر در مکان آلودگی آزاد شده و سلول‌های میزبان پس از تماس با فیتوتوکسین‌ها، برای نفوذ بیمارگر و آغاز کلونیزاسیون مهیا می‌گردند. تقریباً ۲۰ نمونه از این فیتوتوکسین‌ها شناخته شده‌اند که اغلب آنها توسط گونه‌های Alternaria (والتون، ۱۹۹۶) و Cochliobolus (والتون، ۱۹۹۶) و سه توکسین توسط قارچ‌های Bipolaris (سوگاوارا و همکاران، ۱۹۸۵)، Periconia (آلیس و همکاران، ۲۰۰۱) و Phyllosticta (یودر، ۱۹۷۳) تولید می‌شوند. در زیر بعضی از نمونه‌های شناخته شده فیتوتوکسین‌های اختصاصی میزبان اشاره شده است (جدول۲-۱).

Victorin (HV-Toxin): عامل بیماری بلایت ویکتوریا در جو قارچ *Cochliobolus victoria* (Helminthosporium) بوده و توانایی تولید این توکسین را دارا می‌باشد. بلایت ویکتوریایی

1 - host- selective toxins

اولین بار توسط میهمن و مرفی (۱۹۴۶) گزارش شد و تنها بر روی لاین‌های جو مقاوم به زنگ طوقه یافت شد. حساسیت جو به ویکتورین و بنابراین حساسیت به بیمارگر به شرط وجود الل غالب در جایگاه *Vb* است یعنی تمام ژنوتیپ‌های غالب حساس به ویکتورین هستند و تمام ژنوتیپ‌های مغلوب (*vb vb*) مقاوم به توکسین هستند. جوهای ویکتوریا از اروگوئه برای استفاده به عنوان منبع مقاوم به زنگ طوقه (عامل بیماری قارچ *Puccinia coronata*) به آمریکا وارد شدند. دلیل مقاومت جوهای ویکتوریا به زنگ طوقه به ژن غالب *Pc2* برمی‌گردد و با ایجاد موتانت در آنها، لاین‌های حاصله حساس به زنگ طوقه شدند و این نشان داد که دو ژن *Pc2* و *Vb* بسیار نزدیک به هم هستند و ویکتورین ممکن است با یک ژن مقاومت برای ایجاد پاسخ‌های دفاعی وارد عمل شود، به صورتی که در مطالعات فیزیولوژیکی مشاهده شده ویکتورین تحریک تولید بسیاری از پاسخ‌های گیاه را که در برابر الیستورهای غیر بیماری‌زا رخ می‌دهند مانند رسوب کالوز، پراکسیداسیون چربی‌ها، سنتز فیتوالکسین-ها و ... را سبب می‌شود، همچنین ویکتورین به علت اتصال به کمپلکس آنزیمی glycine decarboxylase در غشاهای میتوکندریایی باعث اختلال در میتوکندری و نهایتاً تحریک مرگ برنامه-ریزی شده (PCD[1]) در نتیجه خسارت سلولی شدید می‌شود.

AK-Toxin: عامل بیماری لکه سیاه گلابی قارچ *Alternaria kikuchiana* می‌باشد (ناکاشیما، ۱۹۸۵). این توکسین منجر به از دست رفتن سریع یون پتاسیم و فسفات از سلول‌های حساس برگ می‌شود، در نتیجه غشاء پلاسمایی به طرف داخل کشیده شده و دیواره سلول تخریب می‌شود.

HC-Toxin: عامل بیماری لکه برگی در ذرت قارچ *Cochliobolus carbonum* (*Helminthosporium carbonum*) می‌باشد (والتون و همکاران، ۱۹۸۲). حساسیت به توکسین مشروط به وجود الل غالب در جایگاه *Hm1* است. این ژن کد کننده یک کربونیل ردوکتاز، HC-Toxin reductase (HCTR) است که باعث غیر فعال شدن توکسین از طریق کاهش عملکرد کتون بر

1 - programmed cell death

روی زنجیره فرعی 2-amino-8-oxo-9,10-epoxyoctadecanoic acid می‌شود. همچنین این توکسین مانع از عملکرد آنزیم هیستون داستیلاز می‌شود که این آنزیم از داستیله شدن هسته هیستون H3 و H4 در کروماتین جلوگیری می‌کند که تغییر در استیلاسیون این هیستون‌ها بر روی سیستم‌های درگیر در بیان ژن‌هایی که ممکن است در دفاع درگیر باشند اثر می‌گذارد مثلاً ژن‌های کد کننده پروتئین‌های مرتبط با بیمارگرها و یا پروتئین‌هایی که باعث تقویت دیواره سلولی می‌شوند. با این توضیحات این توکسین مانع از عملکرد مکانیسم‌های مقاومت می‌شود و به عنوان یک بازدارنده پاسخ‌های دفاعی عمل می‌کند (به عبارت دیگر یک فاکتور بیماری‌زا محسوب می‌شود).

T-Toxin (HMT-Toxin): عامل بیماری لکه برگی ذرت قارچ *Cochliobolus heterostrophus* (*Helminthosporium maydis*) نژاد T می‌باشد. همچنین قارچ *Mycosphaerella zeae-maydis* توانایی تولید این توکسین را دارا می‌باشند (لوینگ و همکاران، ۱۹۹۵). بیماری لکه برگی ذرت بیماری است که در ذرت نر عقیم (cms-T) رخ می‌دهد و T-toxin توکسین انتخابی برای این ذرت‌ها می‌باشد. لاین‌های والدینی ذرت نر عقیم به شدت برای تولید دانه‌های هیبرید در اوایل دهه ۱۹۵۰ و ۱۹۶۰ استفاده می‌شدند و متعاقباً اغلب ذرت‌های رشد یافته در امریکا در این دوره از این نوع بودند که منجر به اپیدمی شدید بلایت برگی ذرت در ۱۹۷۰ شد. این توکسین باعث تشکیل منفذ در غشاء میتوکندری گیاهان cms-T و نهایتاً مرگ برنامه‌ریزی شده سلول می‌شود. آنالیز ژنوم‌های میتوکندری cms-T منجر به کشف ژن *T-urf13* شد که کد کننده یک پروتئین ۱۳ کیلودالتونی (URF13) مستقر در غشاء میتوکندری می‌باشد.

ALL-Toxin: عامل بیماری شانکر ساقه گوجه فرنگی قارچ *Alternaria alternata* f.sp. *lycopersici* می‌باشد (بالانس و همکاران، ۱۹۹۶و اسای و همکاران، ۲۰۰۰). این توکسین باعث ایجاد مرگ برنامه-ریزی شده سلول‌ها می‌شود که پاسخ دفاعی گیاه را تحریک می‌کند. همراه با این پاسخ‌های دفاعی

مسیرهای سیگنال‌دهی وابسته به اسید سالسیلیک، جاسمونات و اتیلن نیز نیاز هستند بنابراین به نظر می‌رسد این پاسخ‌ها شبیه یک پاسخ دفاعی ایجاد شده توسط یک عامل غیر بیماری‌زا باشد.

HS-Toxin: عامل بیماری لکه برگی نیشکر قارچ *Bipolaris (Helminthosporium) sacchari* می‌باشد (برندوگت، ۲۰۰۱). این توکسین توسط قارچ فوق ترشح و باعث اختلال در عملکرد غشاء پلاسمایی سلول گیاه میزبان می‌شود. در اغلب بیمارگرهای گیاهی بیوسنتز آزمایشگاهی توکسین نیاز به فاکتورهای شیمیایی موجود در میزبان دارد. به طور مثال سنتز توکسین HS تولید شده از *H. sacchari* تنها هنگامی صورت می‌گیرد که عصاره‌ای از نیشکر به محیط کشت افزوده گردد.

اگر توجه شود فیتوتوکسین‌ها بر اساس انتخاب حرف اول جنس و گونه بیمارگرهای تولید کننده آنها نامگذاری شده‌اند.

Serine protease: آنزیم سرین پروتئاز ترشحی از اوومایست *Phytophthora infestans* عامل بادزدگی گوجه فرنگی به عنوان توکسین شناسایی شده است (تیان و همکاران، ۲۰۰۵). سرین پروتئاز subtilisin P69B یکی از PR پروتئین‌های موجود در گوجه فرنگی است که مرتبط با پاسخ‌های دفاعی گیاه می‌باشد. بازدارندگی پاسخ‌های دفاعی ایجاد شده توسط گیاه به واسطه پروتئازها، می‌تواند یکی از استراتژی‌های متفاوتی باشد که بیمارگرهای گیاهی بتوانند در گیاه زنده باقی بمانند و بافت گیاه را مورد حمله قرار دهند. بیمارگر گیاهی *Ph. infestans* با تولید دو بازدارنده سرین پروتئاز خارج سلولی (EPI1 و EPI10) باعث بازدارندگی فعالیت subtilisin P69B موجود در آپوپلاست گوجه فرنگی می‌شود و به این طریق ایجاد بیماری می‌نماید.

جدول۲-۱: توکسین‌های اختصاصی شناخته شده بیماری‌های قارچی مختلف

بیمارگر	میزبان/پاتوتیپ	بیماری	توکسین	ساختمان شیمیایی	تأثیر بیولوژیک در گیاه	مرجع
Helminthosporium victoriae	جو	بلایت ویکتوریا جو	HV (Victorin)	پپتید حلقوی کلره	مرگ برنامه‌ریزی شده سلول	میهمن و مرفی، ۱۹۴۶
Alternaria kikuchiana	گلابی ژاپنی	لکه سیاه گلابی	AK	استرهای اپوکسی	تخریب دیواره سلولی	ناکاشیما، ۱۹۸۵
Helminthosporium carbonum	ذرت	لکه برگی و ریشه ذرت	HC	تتراپپتید حلقوی	بازدارنده پاسخ‌های دفاعی	والتون و همکاران، ۱۹۸۲
Alternaria fragariae	توت فرنگی	لکه سیاه توت فرنگی	AF	استرهای اپوکسی	اختلال در عملکرد غشاء پلاسمایی	نامیکی و همکاران، ۱۹۸۶
Mycosphaerella zea-maydis	ذرت	لکه برگی ذرت	PM	پلی‌کتول‌های خطی	اختلال در عملکرد میتوکندی	آیر و پنارودریگوز، ۱۹۸۷
Alternaria citri	نارنگی	لکه قهوه‌ای نارنگی	ACT	استرهای اپوکسی	تخریب دیواره سلولی	نیشمورا و ناکاتسوکا، ۱۹۸۹؛ ایتوه و همکاران، ۱۹۸۹
Helminthosporium maydis race T	ذرت	لکه برگی ذرت	HMT (T)	پلی‌کتول‌های خطی	تشکیل منفذ در غشاء میتوکندری	لوینگ و همکاران، ۱۹۹۵
Alternaria alternata f.sp. *lycopersici*	گوجه فرنگی	شانکر ساقه گوجه فرنگی	AAL	استرهای آمینوپنتول	مرگ برنامه‌ریزی شده سلول	بالانس و همکاران، ۱۹۹۶؛ اسای و همکاران، ۲۰۰۰
Alternaria mali	سیب	لکه سیاه سیب	AM	تتراپپتید حلقوی	کاهش سریع مقدار کلروفیل	یوبیلو و همکاران، ۱۹۹۶

جدول۲-۱: توکسین‌های اختصاصی شناخته شده بیماری‌های قارچی مختلف

بیمارگر	میزبان/پاتوتیپ	بیماری	توکسین	ساختمان شیمیایی	تأثیر بیولوژیک در گیاه	مرجع
Pyrenophora tritici-repentis	گندم	لکه خرمایی گندم	Ptr ToxA	پروتئین ۱۳/۲ kDa	بازدارنده سنتز پروتئین و RNA	کولمر، ۱۹۹۸
	گندم	لکه خرمایی گندم	Ptr ToxB	پروتئین ۶/۶ kDa	بازدارنده سنتز پروتئین و RNA	کولمر، ۱۹۹۸
Periconia circinata	سورگوم	پوسیدگی ریشه و طوقه سورگوم	Peritoxin (PC-Toxin)	پلی‌کتیدپپتیدیل کلره	افزایش سنتز تعدادی از پروتئین‌ها	اهن و والتون، ۱۹۹۸
Helminthosporium sacchari	نیشکر	لکه برگی نیشکر	HS	سسکویترپن گلیکوزیله	اختلال در عملکرد غشاء پلاسمایی	برندوگت، ۲۰۰۱
Fusarium eumartii	سیب زمینی	پوسیدگی سیب زمینی	Serine protease	پروتئین	سرکوب کردن پاسخ های دفاعی	اولیویری و همکاران، ۲۰۰۲
Phytophthora infestans	گوجه فرنگی	بادزدگی گوجه فرنگی	Serine protease	پروتئین	سرکوب کردن پاسخ های دفاعی	تیان و همکاران، ۲۰۰۵

۲-۲-۲- فیتوتوکسین‌های غیراختصاصی میزبان[1]

بسیاری از باکتری‌ها و قارچ‌های بیماری‌زای گیاهی ترکیبات فیتوتوکسینی تولید می‌کنند که باعث بیماری‌زایی در گیاهان می‌شوند. اکثر این ترکیبات غیراختصاصی هستند و این ترکیبات بر روی دامنه‌ی وسیعی از بیمارگرها اثر می‌گذارند. برخی فیتوتوکسین‌های غیراختصاصی، مثل فوزیکوکسین، تریکوتسین، کوروناتین، فزئولوتوکسین، سیرینگومایسین، ماراسمین‌ها و تابتوکسین در بیماری‌زایی یا در توسعه علایم بیماری شرکت می‌کنند، اما درکل عوامل اصلی بیماری‌زا محسوب نمی‌شوند. اگرچه باکتری‌ها فیتوتوکسین‌های غیرانتخابی بسیاری تولید می‌کنند، با این حال همه HST های شناخته شده توسط قارچ‌ها تولید می‌شوند (جدول۲-۲).

۲-۳- نقش فیتوتوکسین‌ها در بیان علایم و بیماری

بررسی موتانت‌های ایجاد شده که قادر به تولید توکسین نمی‌باشند و شدت بیماری را کاهش می‌دهند و یا غیر بیماری‌زا می‌شوند، نقش فیتوتوکسین‌ها در بیماری‌های گیاهی را به خوبی اثبات می‌کنند. به طور مثال بررسی موتانت‌های Tn5 از *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 نشان داد که این موتانت‌ها به علت کمبود ژن‌های مورد نیاز برای سنتز coronatine، قادر به تولید این توکسین در گیاهان نبودند و باعث کاهش علایم بیماری گردیدند (بروکس و همکاران، ۲۰۰۴).

۲-۴- مکانیسم عمل فیتوتوکسین‌ها

همان‌طور که در توضیحات فیتوتوکسین‌ها اشاره گردید، فیتوتوکسین‌ها از طریق بازدارندگی عمل آنزیم، تداخل در ویژگی‌های غشاء و ممانعت از پاسخ‌های دفاعی باعث ایجاد بیماری[2] و یا شدت بیماری[3] می‌شوند. به طور مثال چهار توکسین TA_1، TA_2، fumonisin B1 و australifungin به عنوان بازدارنده‌های سرآمیدسنتتاز آنزیمی درگیر در سنتز اسفنگولیپیدها شناخته شده‌اند که با

1 - host non-selective toxins
2 - pathogenicity
3 - virulence

جدول۲-۲: توکسین‌های غیراختصاصی شناخته شده بیماری‌های قارچی مختلف

بیمارگر	میزبان/پاتوتیپ	بیماری	توکسین	تأثیر بیولوژیک در گیاه	مرجع
Penicillium decumbens	گلرنگ	بلایت خوشه و ساقه گلرنگ	Brefeldin A	مانع از سنتز فیتوالکسین پلی‌استیلینگ در گلرنگ	سینگلتون، ۱۹۵۸؛ تیتجن و همکاران، ۱۹۸۵
Fusicoccum amygdali	هلو و بادام	شانکر هلو و بادام	fusicoccin	باعث باز شدن غیر طبیعی روزنه‌ها و برهم زدن تعادل آب در گیاهان	بالیو و همکاران، ۱۹۹۱؛ بارو و همکاران، ۱۹۷۱؛ مار و همکاران، ۱۹۸۹
Alternaria alternata	گیاهان عالی	ایجاد کلروز در گیاهان عالی	tentoxin	مانع از فسفریلاسیون نوری در کلروپلاست، ایجاد نکروز و مانع از فعالیت پلی‌فنول‌اکسیداز	میبر و همکاران، ۱۹۷۴؛ تمپلتون، ۱۹۷۲؛ واقن و دوکو، ۱۹۸۱
Cochliobolus miyabeanus	برنج	لکه قهوه‌ای برنج	Ophiobolins	تأثیر بر روی نفوذپذیری سلول‌های گیاه	تیپتون و همکاران، ۱۹۷۷
Cercospora kikuchii	سویا	لکه برگی سویا	cercosporin	پراکسیداسیون لیپیدها و تخریب دیواره سلولی	ویس و همکاران، ۱۹۸۷؛ استینکمپ و همکاران، ۱۹۸۱
Phoma macdonaldii	آفتابگردان	ساقه سیاه آفتابگردان	zinniol	اختلال در تنظیم کلسیم	کوتی و همکاران، ۱۹۸۳؛ سوگاوارا و استروبل، ۱۹۸۶

جلوگیری از عملکرد این آنزیم منجر به تجمع بازهای اسفینگوئید می‌شوند که سمیت ایجاد می‌شود. همچنین اغلب فیتوتوکسین‌های قارچی باعث بازدارندگی پاسخ‌های دفاعی گیاه می‌شوند، به طور مثال helminthosporal توکسین تولیدی از قارچ *Cochliobolus sativus* به شدت باعث بازدارندگی β-1,3-glucan synthase، آنزیم مسئول سنتز کالوز می‌شود (بریکوت و همکاران، ۱۹۹۸). گیاهان می‌توانند از طریق جذب نکردن فیتوتوکسین‌ها و یا تبدیل آنها به مواد با سمیت کمتر با آنها مقابله کنند. به طوری که موتانتی از آرابیدوپسیس شناسایی شده است که سرعت جذب کمتری از فیتوتوکسین‌های thaxtomin نسبت به تیپ وحشی دارد و متعاقباً مقاوم‌تر به فیتوتوکسین‌ها می‌باشد. این ژن تیپ وحشی در تمام ژنوم‌های یوکاریوتی توالی‌یابی شده دارای همولوگ است که کد کننده پروتئینی کوچک و تنظیم کننده مکانیسم انتقال است (اسچیبل و همکاران، ۲۰۰۳). همچنین تبدیل فیتوتوکسین‌ها به ترکیبات با سمیت کمتر توسط گیاهان و میکروارگانیسم‌های دیگر موضوع قابل توجهی است، به طوری که گیاهانی که قادر به تبدیل فیتوتوکسین‌های با سمیت کمتر هستند در اصلاح نباتات برای مقاومت به ارگانیسم‌های توکسیژنیک با ارزش هستند و میکروارگانیسم‌هایی که چنین توانایی دارند نیز به عنوان عوامل بیوکنترلی برای بیمارگرهای توکسیژنیک استفاده می‌شوند و برای تولید بیوتکنولوژی محصولات مقاوم مناسب هستند. گلیکوزیلاسیون مکانیسمی است که از این طریق ترکیبات می‌توانند سمیت کمتری داشته باشند به طور مثال، maculosin توسط *Centaurea maculosa* تبدیل به حداقل سه ترکیب قطبی می‌شود که یکی از آنها به عنوان maculosin β-*O*-glucoside شناخته شده است که سمیتی برای *C. maculosa* و هیچ گیاه دیگری ندارد (پارک و همکاران، ۱۹۹۴).

جدایه‌ای از *Pantoea dispersa* به عنوان عامل بیوکنترلی، قادر به غیر سمی کردن فیتوتوکسین‌های albicidin تولید شده توسط *Xanthomonas albilineans* عامل سوختگی برگ نیشکر می‌باشد (زانگ و بیرچ، ۱۹۹۷) و با کلون کردن ژن مربوطه و بیان شدن ژن در گیاهان نیشکر تراریخته،

گیاهان آلوده به این بیمارگر دیگر علایم کلروتیک که از نشانه‌های بارز این بیماری است را نشان ندادند (زانگ و همکاران، ۱۹۹۹).

۲-۵- بهره‌برداری از فیتوتوکسین‌ها

هنگامی که فیتوتوکسین تولید شده توسط بیمارگرهای گیاهی، یک عامل بیماری‌زا (توانایی ایجاد بیماری) محسوب شود و یا در شدت بیماری‌زایی نقش داشته باشد ممکن است از آنها در به وجود آوردن گیاهان مقاوم به بیماری استفاده کرد. یکی از راه‌هایی که ممکن است انجام شود استفاده از فیتوتوکسین‌ها به عنوان عاملی انتخابی برای ژنوتیپ‌هایی است که حساس هستند به همین دلیل اگر توکسین یک عامل بیماری‌زایی باشد گیاهان کاملاً مقاوم به بیمارگر تولید کننده توکسین خواهند بود و اگر توکسین عاملی در شدت بیماری‌زایی باشد گیاهان نسبت به گیاهان حساس بیشتر مقاوم خواهند بود. به عنوان مثال گیاهانی انتخاب می‌شوند که دارای آنزیم تبدیل فیتوتوکسین‌ها به مواد غیر سمی هستند یا گیاهانی که ممکن است از نظر ژنتیکی با یک ژن کد کننده چنین آنزیمی تغییر کرده باشند. در بعضی موارد مشخص است که چرا یک گیاه به بیمارگر توکسیژنیک مقاوم است. به طور مثال ذرت با الل *Hm1* از طریق از بین بردن گروه کربونیل موجود در زنجیره فرعی توکسین HC قادر به غیر سمی کردن این توکسین تولید شده توسط *H. carbonum* می‌باشد و پیدا کردن ژنوتیپ-هایی با این الل غالب دشوار نیست و می‌توان در برنامه‌های اصلاح نباتات از آنها استفاده کرد. در بعضی موارد از خود بیمارگرهای تولید کننده توکسین نیز می‌توان در تولید گیاهان مقاوم استفاده کرد. به طور مثال *Pseudomonas phaseolicola* توکسین phaseolotoxin ترشح می‌کند که بازدارنده اورنیتین کربامیل ترانسفراز است و سنتز سیترولین را کاتالیز می‌کند. با این حال این باکتری به دلیل داشتن دو ژن *OCT* که یکی از آنها آنزیم argK را کد می‌کند و باعث ایجاد مقاومت به توکسین شده و تحت تأثیر توکسین قرار نمی‌گیرد (لوپز و همکاران، ۲۰۰۴) و هنگامی که این ژن به گیاه تنباکو انتقال داده شد بیشتر گیاهان به توکسین غیر حساس شدند (هتزیلوکاس و پانوپولوس، ۱۹۹۲).

راه دیگر استفاده از فیتوتوکسین‌ها این است که اگر آنها به اندازه کافی انتخابی باشند بتوان از آنها در کنترل علف‌های هرز استفاده کرد. به طور مثال فیتوتوکسین‌های AAL و fumonisin برای گیاهان گوجه فرنگی با ژنوتیپ *asc/asc* اختصاصی هستند و همچنین برای علف‌های هرز jimsonweed و black nightshade سمی هستند و همان طور که قبلاً اشاره گردید این سه توکسین به علت بازدارندگی سرآمید سنتتاز منجر به تجمع بازهای اسفنگولیپیدها و در نهایت ایجاد سمیت می‌شوند (اباس و همکاران، ۱۹۹۴).

قارچ *Septoria cirsii* برای *Cirsium arvense* اختصاصی است و عامل کلروزیس و نکروزیس برگ‌ها می‌باشد. هنگام کشت قارچ، فیتوتوکسین شناخته شده β-nitropropionic acid تولید می‌شود که چنین علایم مشابهی را در برگ‌ها سبب می‌شود و علاوه بر این باعث بازدارندگی جوانه‌زنی دانه و طویل شدن ریشه می‌شود، از این رو از این قارچ و توکسین برای بیوکنترل *Cirsium arvense* استفاده می‌شود (هرشنهورن و همکاران، ۱۹۹۳).

با توجه به این‌که فیتوتوکسین‌ها گروهی از مواد مؤثر در فرآیند بیماری‌زایی هستند و می‌توان از آنها به عنوان عوامل انتخابی در ایجاد یک سیستم غربال‌گری آزمایشگاهی موفقیت‌آمیز در تولید گیاهان مقاوم استفاده کرد، اهداف این بررسی، استخراج و شناسایی فیتوتوکسین‌های مترشحه (متابولیت‌ها) از قارچ *Monosporascus cannonballus* و همچنین استفاده از سکروتوم این قارچ در کشت بافت خربزه به منظور دست‌یابی به پایه‌های متحمل خربزه می‌باشند و در فصل بعد به توضیح مفصل راجع به چگونگی تهیه متابولیت‌های قارچ مذکور، خالص‌سازی، اثبات بیماری‌زایی و شناسایی متابولیت‌ها پرداخته شده است.

فصل ۳:

مواد و

روش‌ها

۳-۱- مواد

۳-۱-۱- مواد شیمیایی و مواد گیاهی

کلیه مواد شیمیایی مورد مصرف از شرکت (Merk, Darmstdt, Germany) تهیه شدند مگر این‌که در متن به آن اشاره شده باشد و مواد گیاهی مورد مصرف شامل بذور خربزه، کدو، طالبی، گندم، جو و گوجه فرنگی جهت استفاده در آزمایش‌های اثبات بیماری‌زایی، اختصاصی و غیراختصاصی بودن میزبانی مواد فیتوتوکسینی جداسازی شده، از مؤسسه گیاهپزشکی کشور تهیه شدند.

۳-۱-۲- جدایه قارچ

جدایه ۲۷۳ قارچ *M. cannonballus* از مؤسسه گیاهپزشکی کشور (جداسازی شده از میزبان خربزه در سال ۱۳۸۹ در کاشان) دریافت شد.

۳-۱-۳- محیط کشت‌های اختصاصی قارچ *M. cannonballus*:

جهت تکثیر و کشت جدایه ۲۷۳ قارچ *M. cannonballus*، سه نوع محیط کشت PDA، FCM و Czapeck's مورد استفاده قرار گرفتند. از محیط PDA (۳۹/۵ گرم در لیتر PDA حاوی ۲۵۰ میلی-گرم در لیتر استرپتومایسین) برای تکثیر جدایه قارچی استفاده شد و از محیط کشت FCM (فریز و همکاران، ۱۹۹۱) و Czapeck's (جدول ضمیمه ۱ و ۲) برای کشت جدایه قارچ و جداسازی متابولیت‌های قارچی استفاده شد. از محیط کشت FCM در ابتدا استفاده گردید اما به دلیل مقدار کم بعضی از مواد موجود در آن و امکان اشتباه در وزن کردن آنها، آلودگی مشاهده می‌شد بنابر این از محیط کشت Czapeck's به دلیل حساسیت کمتر آن برای کشت قارچ و جداسازی متابولیت‌ها استفاده شد.

۳-۲- روش بررسی

۳-۲-۱- تهیه متابولیت‌های قارچی

پس از رشد قارچ در محیط PDA، دو بلوک قارچ از کشت ۴ روزه *M. cannonballus* به هر فلاسک حاوی ۲۵۰ میلی‌لیتر محیط کشت Czapeck's اضافه و به مدت ۲۱ روز به علت کند رشد بودن قارچ در انکوباتور ۲۸ درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شدند. پس از آن‌که قارچ در فلاسک‌ها رشد نمود محیط کشت حاوی میسلیوم‌های قارچ را از قیف باخنر و کاغذ واتمن No.1 (Merk, Darmstdt, Germany) به وسیله پمپ خلاء عبور داده، به این طریق مسیلیوم‌ها را جدا و مایع به دست آمده که مخلوطی از محیط کشت Czapeck's و متابولیت‌های قارچ است از فیلترهای میکروپور (۰/۴۵ میکرومتر) (Sartorious AG, Gottingen, Germany) برای استریل کردن عبور داده و در ظرف استریل نگه‌داری شدند.

۳-۲-۲- خالص سازی مقدماتی متابولیت‌های (فیتوتوکسین‌های) قارچی

برای خالص سازی مقدماتی مواد با وزن مولکولی پایین از متابولیت‌های با وزن مولکولی بالا (احتمالاً پروتئین‌ها)، مایع به دست آمده با استفاده از فیلتر آمیکون YM-10 (Millipore Corporation, Bedford, MA) با قابلیت تفکیک ۱۰ کیلودالتون در دور g × ۶۰۰۰ سانتریفیوژ و به این طریق متابولیت‌های بالا و زیر ۱۰ کیلودالتون جداسازی شدند (شکل۳-۱).

مایعی که روی غشاء فیلتر قرار گرفته متابولیت‌های بالای ۱۰ کیلودالتون (احتمالاً پروتئین‌ها) را تشکیل می‌دهد و برای جدا کردن هر گونه ناخالصی از آنها از جمله مواد با وزن مولکولی پایین، آب مقطر اضافه گردید و در دور g× ۶۰۰۰ سانتریفیوژ شد (این عمل سه بار تکرار شد). برای به دست آوردن غلظت پروتئین محلول، یک میلی‌لیتر بافر تریس-اسید کلریدریک ۱ مولار با pH=۷/۲ اضافه کرده و پروتئین‌ها کاملاً در این بافر حل و سپس به روش برادفورد (برادفورد، ۱۹۷۶) غلظت سنجی گردید (ضمیمه ۳).

شکل۳-۱: فیلتر کردن مایع با استفاده از فیلتر آمیکون YM-10 با قابلیت تفکیک ۱۰ کیلودالتون (خالص سازی مقدماتی متابولیت‌های بالا و زیر ۱۰ کیلودالتون قارچ صورت گرفت).

۳-۲-۲-۱- آزمون اثبات بیماری‌زایی سکروتوم (متابولیت‌های بیشتر از ۱۰ کیلودالتون) در گیاه خربزه

برای اطمینان از خاصیت فیتوتوکسینی سکروتوم، گیاهان خربزه کشت شده ۴ تا ۵ برگی مورد آزمایش قرار گرفتند. ۱۰۰ میکرولیتر سکروتوم خالص شده با غلظت ۰/۱۸۴ µg/ml، آب مقطر و Czapeck's (به عنوان شاهد) داخل برگ‌های کوتیلدونی و برگ‌های حقیقی با استفاده از سرنگ تزریق شدند. سپس گیاهان تیمار شده یک شب در تاریکی و بعد از آن در دمای ۲۲-۱۸ درجه سانتی‌گراد، تحت شرایط نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی تا ۱۲۰ ساعت قرار گرفتند و از برگ‌ها تصویربرداری به عمل آمد.

۳-۲-۲-۲- تأثیر دما روی فعالیت بیولوژیکی سکروتوم (متابولیت‌های بیشتر از ۱۰ کیلودالتون)

برای آزمایش تأثیر دما، ۱۰۰ میکرولیتر سکروتوم با غلظت ۰/۱۸۴ µg/ml در ۱۰۰ درجه سانتی-گراد به مدت یک ساعت تیمار گرمایی شدند و به همراه، آب مقطر و Czapeck's (به عنوان شاهد) داخل برگ‌های حقیقی و کوتیلدونی خربزه با استفاده از سرنگ تزریق شدند. سپس گیاهان تیمار شده یک شب در تاریکی و بعد از آن در دمای ۲۲-۱۸ درجه سانتی‌گراد، تحت شرایط نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی تا ۱۲۰ ساعت قرار گرفتند و از برگ‌ها تصویر برداری به عمل آمد.

۳-۲-۲-۳- خالص‌سازی سکروتوم (متابولیت‌های بیشتر از ۱۰ کیلودالتون) با استفاده از الکتروفورز ژل سدیم دودسیل سولفات- پلی‌آکریل‌آمید (SDS-PAGE)

بعد از یافتن غلظت پروتئین محلول، برای جداسازی مواد تشکیل دهنده و شناسایی آنها از روش الکتروفورز ژل سدیم دودسیل سولفات- پلی‌آکریل‌آمید استفاده شد (سام بروک و روسل، ۲۰۰۱). ژل شامل دو قسمت ژل تفکیک کننده با غلظت ۱۵ درصد و ژل متراکم کننده با غلظت ۵ درصد آکریل-آمید بود. ۱۲ میکرولیتر سکروتوم (متابولیت‌های بالای ۱۰ کیلودالتون) با غلظت ۰/۱۸۴ µg/ml با ۲/۵ میکرولیتر از protein loading dye (Life Science, UK) مخلوط شد و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای

۷۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده و سپس روی ژل برده شد. حدود ۵ میکرولیتر نیز protein ladder (۱۰ تا ۲۲۰ کیلودالتون) (Life Science, UK) استفاده گردید. الکتروفورز در ولتاژ ثابت ۱۸۰ ولت و ۳۰ میلی‌آمپر به مدت ۲ ساعت انجام گرفت. سپس ژل در محلول فیکساتیو آب: استیک اسید: اتانول به نسبت‌های ۱: ۶: ۳ به مدت ۱۵ دقیقه قرار داده شد و بعد از آن با آب مقطر استریل شست و شو، سپس در محلول کوماسی‌بلو (R-250) ۰/۰۱ درصد (w/v) (Sigma, St Louis, MO, USA) به مدت یک شبانه‌روز رنگ‌آمیزی صورت گرفت. روز بعد ژل به مدت ۲ ساعت با آب مقطر استریل رنگ‌بری شد و سپس از ژل عکس گرفته شد. با تیغ استریل باندهای تشکیل شده روی ژل برای توالی‌یابی بریده شدند.

۳-۲-۲-۴- شناسایی باندهای پروتئینی به دست آمده

توالی‌یابی باندهای پروتئینی تشکیل شده روی ژل، از طریق Mass Spectrometry (MS-MALDI-TOF) در دانشگاه یورک انگلیس از طریق نرم افزار Mascot و protein blast صورت گرفت. همچنین دندروگرام فیلوژنی پروتئین‌های شناسایی شده نیز از روش neighbor-joining توسط نرم-افزار mega5 با ۱۰۰۰ bootstrap رسم گردید.

۳-۲-۲-۵- آزمون اثبات بیماری‌زایی مواد با وزن مولکولی پائین در گیاه خربزه

برای اطمینان از خاصیت فیتوتوکسینی مواد با وزن مولکولی پائین[1]، گیاهان خربزه کشت شده ۴ تا ۵ برگی مورد آزمایش قرار گرفتند. سکروتوم زیر ۱۰ کیلودالتون خالص شده (۱۰۰میکرولیتر)، آب مقطر استریل و Czapeck's (به عنوان شاهد) داخل برگ‌های کوتیلدونی و برگ‌های حقیقی با استفاده از سرنگ تزریق شدند. سپس گیاهان تیمار شده یک شب در تاریکی و بعد از آن در دمای ۲۲-۱۸ درجه سانتی‌گراد، تحت شرایط نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی تا ۱۲۰ ساعت قرار گرفتند و از برگ‌ها تصویر برداری به عمل آمد.

1 - low molecular weight componds

۳-۲-۲-۶- تأثیر دما روی فعالیت بیولوژیکی مواد با وزن مولکولی پائین در گیاه خربزه

برای آزمایش تأثیر دما، ۱۰۰ میکرولیتر مواد با وزن مولکولی پائین در ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد به مدت یک ساعت تیمار گرمایی شدند و به همراه، آب مقطر و Czapeck's (به عنوان شاهد) داخل برگ‌های حقیقی و کوتیلدونی خربزه با استفاده از سرنگ تزریق شدند. سپس گیاهان تیمار شده یک شب در تاریکی و بعد از آن در دمای ۲۲-۱۸ درجه سانتی‌گراد، تحت شرایط نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی تا ۱۲۰ ساعت قرار گرفتند و از برگ‌ها تصویر برداری به عمل آمد.

۳-۲-۲-۷- خالص سازی مواد با وزن مولکولی پائین با استفاده از الکتروفورز کاغذی با ولتاژ بالا (HVPE)

مواد با وزن مولکولی پائین (LMWCs) زیر ۱۰ کیلودالتون (۴۰ میلی‌لیتر) توسط rotary evaporator (Buchi Labortechnik, Flawil, Switzerland) در حمام آب گرم با دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد به حدود ۵ میلی‌لیتر تغلیظ و در یخچال در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شدند و بعد از یک روز مقداری از نمک‌های موجود در آن ته‌نشین و حذف گردیدند و مایع رویی (supernatant) با pH = ۶/۴ برداشته شد و به منظور حذف نمک‌های موجود در آن قطره قطره حدود ۵۵ میکرولیتر اسید فرمیک اضافه گردید تا pH به ۳ رسید (در pH کمتر از ۳ مواد فیتوتوکسینی موجود از بین می‌روند)، سپس مایع حاصله را برای رسوب کردن نمک‌های موجود و حذف آنها به مدت یک روز در یخچال نگه داری شد و بعد از آن دوباره رونشین[1] برداشته و برای حذف اسید فرمیک باقی مانده rotary evaporator انجام گرفت. به مایع به دست آمده به منظور حذف نمک‌های باقی مانده و اسید فرمیک، ۲۰۰ میکرولیتر متانول سرد ۷۰ درصد (به علت سرعت تبخیر بالای آن) اضافه گردید که دو فاز غیرشفاف و قهوه‌ای رنگ حاصل شد. فاز غیرشفاف را دور ریخته و مایع قهوه‌ای رنگ حاوی مواد با وزن مولکولی پایین جهت بررسی خاصیت فیتوتوکسینی و نیز شناسایی مورد استفاده قرار گرفتند. به طوری که بر روی کاغذ واتمن No.1 (۹ cm × ۲۳) (Merk, Darmstdt,

1 - supernatant

Germany) به صورت یک سری از نقاط منفرد بارگذاری شدند. هر نقطه‌ی بارگذاری شده شامل ۳ میکرولیتر مواد با وزن مولکولی پائین بود. از آسپارتیک اسید (Asp) با جرم مولکولی ۱۳۳/۱ گرم بر مول تقریباً نزدیک به جرم مولکولی مواد با وزن مولکولی پائین در اولین نقطه به عنوان کنترل (شاهد) بر روی کاغذ استفاده شد. سپس الکتروفورز کاغذ واتمن بارگذاری شده با مواد با وزن مولکولی پائین در بافر اسید استیک ۵/۹۲ درصد (v/v) و اسید فرمیک ۲/۴۸ درصد (v/v) با pH = ۱/۷۵ در ولتاژ ۴۰۰ ولت به مدت ۲۵ دقیقه در یک دستگاه الکتروفورز انجام شد. کاغذ (الکتروفوتوگرام) در مجاورت هوا خشک گردید و به علت این‌که بسیاری از مواد با وزن مولکولی پایین فیتوتوکسینی با رنگ ناین-هیدرین واکنش مثبت نشان می‌دهند، الکتروفوتوگرام با ناین‌هیدرین ۰/۲ درصد (w/v) در استون رنگ‌آمیزی شد و به مدت ۲ تا ۳ دقیقه برای ظاهر شدن نقاطی که با ناین‌هیدرین واکنش مثبت نشان می‌دادند، در ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد حرارت داده شد. ناین‌هیدرین ماده شیمیایی زرد رنگی است که برای شناسایی آمین‌های نوع اول و دوم و آمونیاک به کار می‌رود و هنگام واکنش با اسید آمینه، گروه آمینی و کربوکسیل اسید آمینه آزاد شده و اسید آمینه به صورت آلدهید و ناین‌هیدرین به ماده‌ای به نام هیدرین‌دانتین تبدیل می‌شود که این ماده با گروه آمینی آزاد شده و با یک مولکول دیگر از نین-هیدرین واکنش می‌دهد و رنگ قرمز مایل به بنفش تولید می‌نماید و برای تعیین حرکت نسبی هر کدام از ترکیبات واکنش داده با نین‌هیدرین نسبت به حرکت نسبی آسپارتیک اسید استفاده می‌شود.

برای به دست آوردن مقدار کافی مواد خالص شده به منظور شناسایی آنها، باید آزمایش HVPE حدود ۵۰ بار تحت شرایط یکسان ذکر شده در بالا صورت می‌گرفت. البته برای به دست آوردن مواد خالص جداسازی شده از کاغذها نه همراه با رنگ به جای رنگ‌آمیزی کل الکتروفتوگرام، تنها یک نوار حدوداً ۱ سانتی‌متری که شامل نقطه کنترل و یک نقطه از مواد با وزن مولکولی پائین باشد از سمت چپ کاغذ و یک نوار شامل یک نقطه مواد با وزن مولکولی پائین از سمت راست کاغذ بریده شدند و این دو نوار رنگ‌آمیزی شدند. سپس کاغذ شامل چندین نقطه مواد با وزن مولکولی پائین رنگ‌آمیزی نشده بر اساس موقعیت نقاط ظاهر شده در دو نوار کناری به نوارهایی بریده شدند. متابولیت‌های (ماده با وزن

مولکولی پائین) مربوط به هر نقطه با استفاده از متانول به مدت ۵ دقیقه در دور g× ۶۰۰۰ سانتریفیوژ از کاغذها استخراج و سپس لیوفیلیزه[1] شدند. برای اطمینان از صحت مواد استخراج شده، تحت شرایط ذکر شده در بالا HVPE انجام و با نین هیدرین رنگ‌آمیزی صورت گرفت و وجود مواد مشاهده گردید.

۳-۲-۲-۸- بررسی اختصاصی و غیراختصاصی بودن مواد فیتوتوکسینی جداسازی شده

به منظور دانستن اختصاصی و غیراختصاصی بودن این مواد، گیاهانی از خانواده کدوئیان، گندمیان و جالیز مانند خربزه، کدو، طالبی، گندم، جو و گوجه فرنگی مورد بررسی قرار گرفتند. بذر این گیاهان ابتدا ضدعفونی و بعد از جوانه‌زنی به گلدان‌ها انتقال داده شدند و پس از رشد، تزریق LMWC ها و سکروتوم‌های حاصل به برگ‌های آنها صورت گرفت. گیاهان تا ۱۲۰ ساعت در دمای ۲۲-۱۸درجه سانتی‌گراد در گلخانه نگه‌داری شدند و سپس از برگ‌ها تصویربرداری به عمل آمد.

۳-۲-۲-۹- کشت بافت گیاهان به منظور آنالیز تنوع سوماکلونال

ابتدا پوست مقداری بذر خربزه مشهدی جدا و در وایتکس ۱ درصد (v/v) به مدت ۱۵ تا ۲۰ دقیقه غوطه‌ور شدند و بعد از این مدت بذرها ۴ بار با آب مقطر استریل شست و شو شدند. بعد از خشک شدن روی محیط کشت پایه MS (موراشینگ و اسکوگ، ۱۹۶۲) شامل ساکارز ۱ درصد (w/v)، بنزیل آمینوپورین (BA) (۰/۵ mg/l) و آگار ۸ درصد (w/v) با pH = ۵/۸ قرار گرفتند و یک هفته بعد این گیاهچه‌ها به عنوان منابع ریزنمونه استفاده شدند.

محیط کشت پایه MS با ۳۰ گرم بر لیتر ساکارز و ۸ گرم بر لیتر آگار با غلظت‌های متفاوت هورمون-های 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) (۰، ۲/۵ و ۵ میلی‌گرم بر لیتر) و Benzyl aminopurine (BA) (۰ و ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر) تهیه گردید. pH محیط‌های تهیه شده حدود ۵/۸ قبل از اتوکلاو اندازه‌گیری شدند و سپس در دمای ۱۲۱ درجه به مدت ۱۵ دقیقه اتوکلاو گردیدند. عصاره قارچ *M. cannonballus* کشت داده شده روی محیط کشت مایع Czapeck's بعد از عبور از

1 - lyophilized

کاغذ صافی توسط قیف باخنر و پمپ خلاء و عبور از میلی‌پور که حاوی مواد فیتوتوکسینی هستند بعد از کمی خنک شدن قبل از جامد شدن با غلظت‌های ۰/۵، ۰/۶، ۰/۷، ۰/۸، ۰/۹، ۱، ۱/۵ و ۲ درصد به این محیط کشت‌ها اضافه گردید. از هر کدام از محیط‌های کشت یک لوله به عنوان شاهد در نظر گرفته شد و به آن تنها محیط کشت Czapeck's بدون عصاره قارچ اضافه گردید. هیپوکوتیکول‌ها به قطعات ۴ تا ۵ سانتی‌متری بریده شدند و در این محیط کشت‌ها قرار گرفتند و نمونه‌ها در دمای ۲۵ درجه در تاریکی نگه‌داری شدند و بعد از حدود ۴ هفته محیط کشت‌ها به شرایط نوری با ۱۶ ساعت روشنایی انتقال داده شدند و کالوس‌زایی آنها به منظور استفاده برای تولید پایه‌های مقاوم به متابولیت‌های قارچ بررسی گردید.

فصل ۴:

نتایج

به منظور دست‌یابی به اهداف این تحقیق که شامل استخراج و شناسایی برخی فرآورده‌های نهایی ژن‌های دخیل در بیماری‌زایی مانند فیتوتوکسین‌های قارچ *M. cannonballus* همچنین کشت بافت خربزه و بررسی تنوع سوماکلونال برای به دست آوردن پایه‌های مقاوم خربزه می‌باشند، آزمایش‌ها در دو بخش انجام گردید. ابتدا با رشد قارچ بر روی محیط کشت Czapeck's، متابولیت‌های مترشحه از قارچ تهیه شد و سپس خالص سازی مقدماتی با استفاده از فیلتر آمیکون YM-10 صورت گرفت. بنابراین مواد با وزن مولکولی زیر ۱۰ کیلودالتون و بالای ۱۰ کیلودالتون جداسازی شدند و برای بررسی خاصیت فیتوتوکسینی این مواد، روی برگ‌های گیاه خربزه آزمایش شدند. جداسازی مواد با وزن مولکولی بالا از روش SDS-PAGE و مواد با وزن مولکولی پائین از روش HVPE و شناسایی باندهای پروتئینی به دست آمده از طریق اسپکترومتری جرمی (MS[1]) صورت گرفت. همچنین به منظور دست‌یابی به پایه‌های مقاوم خربزه، کشت بافت گیاهان خربزه در محیط‌های کشت MS همراه با غلظت‌های متفاوت هورمون‌های 2,4-D و BA و غلظت‌های متفاوت متابولیت‌های قارچی انجام شد که نتایج به دست آمده به طور مفصل در زیر شرح داده خواهند شد.

۴-۱- اثبات بیماری‌زایی سکروتوم (بالای ۱۰ کیلودالتون) در گیاه خربزه

برگ‌های تزریق شده با سکروتوم قارچی علایم نکروزیس را بعد از ۱۲۰ ساعت نشان دادند اما برگ‌های تزریق شده با Czapeck's و آب مقطر هیچ نوع علایمی بروز ندادند (شکل۴-۱).

۴-۲- تأثیر دما روی فعالیت بیولوژیکی سکروتوم قارچ

بعد از ۱۲۰ ساعت برگ‌های تزریق شده با Czapeck's، آب مقطر و سکروتوم قارچ که با گرما (در ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد به مدت یک ساعت) تیمار شده بودند هیچ نوع علایمی بروز ندادند و این نشان دهنده این بود که سکروتوم قارچ فعالیت بیماری‌زایی خود را در اثر تیمار با گرما از دست داده است و احتمالاً طبیعت پروتئینی دارد (۴-۲).

1 - mass spectrometry

شکل۴-۱: بررسی تأثیر سکروتوم بالای ۱۰ کیلودالتون روی برگ‌های حقیقی و کوتیلدونی گیاه خربزه. برگ‌های تزریق شده با آب مقطر و محیط کشت Czapeck's هیچ نوع علایمی نشان ندادند در صورتی‌که برگ‌های تزریق شده با سکروتوم بالای ۱۰ کیلودالتون علایم نکروزیس و چروکیدگی برگ را بروز دادند.

شکل۴-۲: بررسی تأثیر سکروتوم بالای ۱۰ کیلودالتون حرارت داده شده. تزریق سکروتوم بالای ۱۰ کیلودالتون به برگ‌های کوتیلدونی خربزه که در ۱۰۰ درجه به مدت ۱ ساعت تیمار شدند نشان داد که سکروتوم توسط حرارت غیرفعال شده و خاصیت فیتوتوکسینی خود را از دست داده است.

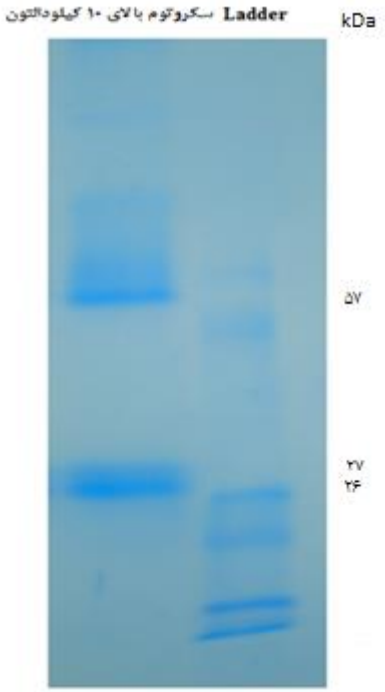
۴-۳- جداسازی و شناسایی سکروتوم قارچ (متابولیت‌های پروتئینی)

سه باند با وزن‌های مولکولی تقریباً ۲۶، ۲۷ و ۵۷ کیلودالتونی از الکتروفورز مواد با وزن مولکولی بالا در SDS-PAGE مشاهده شد (شکل۴-۳) و نشان داد که این مواد ماهیت پروتئینی دارند و قابل توجه است که، هدف در این تحقیق در خصوص القاء قارچ نبود بلکه این‌ها پروتئین‌هایی هستند که همواره بیان می‌شوند و در بیماری‌زایی قارچ نقش دارند. سپس طبق نتایج توالی‌یابی، باند با وزن مولکولی تقریبی۵۷ کیلودالتون مشابه با alpha-1,2-mannosidase موجود در *Phytophthora infestans (T30-4)* شناسایی گردید (شکل۴-۴). همچنین طبق نتایج به دست آمده از اسپکترومتری جرمی باندهای با وزن مولکولی تقریبی۲۶ و ۲۷ کیلودالتونی بسیار به یکدیگر مشابه (شکل۴-۵) و احتمالاً ایزوزیم‌های یک آنزیم هستند که با آنزیم serine protease موجود در *Lecanicillium psalliotae* همولوژی دارند (شکل۴-۶). جالب توجه است اشاره گردد، آنزیم سرین پروتئاز در *Fusarium eumartii* عامل پوسیدگی سیب زمینی (اولیویری و همکاران، ۲۰۰۲) و *Phytophthora infestans* عامل بادزدگی گوجه فرنگی (تیان و همکارن، ۲۰۰۴) نیز به عنوان توکسین شناسایی شده است.

با استفاده از لیست توالی‌های ذکر شده برای دو آنزیم آلفا- مانوزیداز و سرین پروتئاز در جدول ۴-۱، ابتدا توالی‌ها توسط clustalw همردیف سازی شدند و سپس از روش neighbor-joining توسط نرم-افزار mega5 دندروگرام فیلوژنی با ۱۰۰۰ bootstrap رسم گردید (شکل۴- ۷ الف و ب).

۴-۴- اثبات بیماری‌زایی مواد با وزن مولکولی پائین در گیاه خربزه

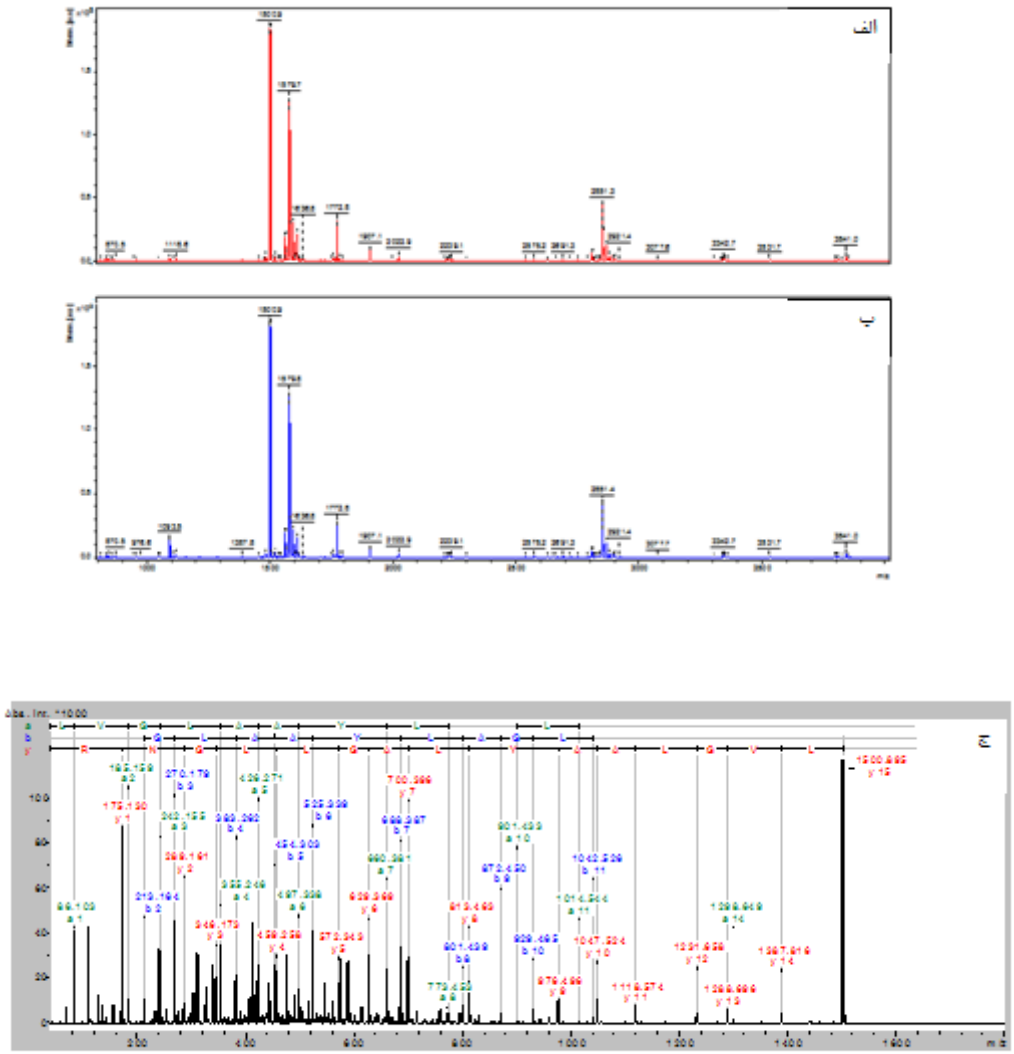
برگ‌های تزریق شده با مواد با وزن مولکولی پائین علایم نکروزیس را بعد از ۱۲۰ ساعت نشان دادند اما برگ‌های تزریق شده با Czapeck's و آب مقطر هیچ نوع علایمی بروز ندادند (شکل۴-۸).



شکل۴-۳: SDS-PAGE سکروتوم با وزن مولکولی بالاتر از ۱۰ کیلودالتون. سه باند اصلی با وزن‌های مولکولی تقریبی ۲۶، ۲۷ و ۵۷ کیلودالتون مشاهده گردید.

```
  1 MLPSYSPKGR KRSQQLPLWK RVALIGLICI LLLFLWVQYT ILTTNLGGVP
 51 AHVGELQGAT NQVAQRPEDN HNEQAHLRGD EHQQQPSEIN AVNHATGGGG
101 AGAGHDVVDE MLADEVVADV EDPDKTVTAV PSEQQESRRL AVRKAMKFAW
151 GNYEEHAFGG DEVDPKNGWK RSNVWGDIAC SMVDGIDTLW IMDLKDEFQR
201 ARDYVANQLD FSHLGRDGNK LSVFETIIRE VGGLLSAFDL SGDTIFKEKA
251 RELMDILTPA FDKEEGVFYT LFNPYTKEKS FAGWAGFRAH IADIGTLQLE
301 TRYLSDITGD PKYAEMGDAF YQILKREGSY KKTGFVITLG ALGDSFYEYL
351 LKVYIYSGKR EEDEYLRELY DDAVRGMEEH LLYFSIPDDL YFLQEMKVPS
401 FSAVQRMDHL LCFVPGLLAL GTLSETEDHA KNAKHLELAE KLMETCYQLY
451 HRQPTGLSPD IVSFPKMQVI DPKYRLRPET IESLFYMYRV TKNPKYREYG
501 WEIFQALETH AKVKHGYAAI LDVTQLPAQT ENKMESFFLA ETLKYHYLLQ
551 APETLIPLDK YVFNTEAHPL RIRRRN
```

شکل۴-۴: توالی آنزیم alpha-1,2-mannosidase شناسایی شده در قارچ *M.cannonballus*. طبق نتایج توالی‌یابی، باند با وزن مولکولی تقریبی۵۷ کیلودالتون مشابه با مانوزیداز نوع آلفا موجود در *Phytophthora infestans (T30-4)* شناسایی گردید.



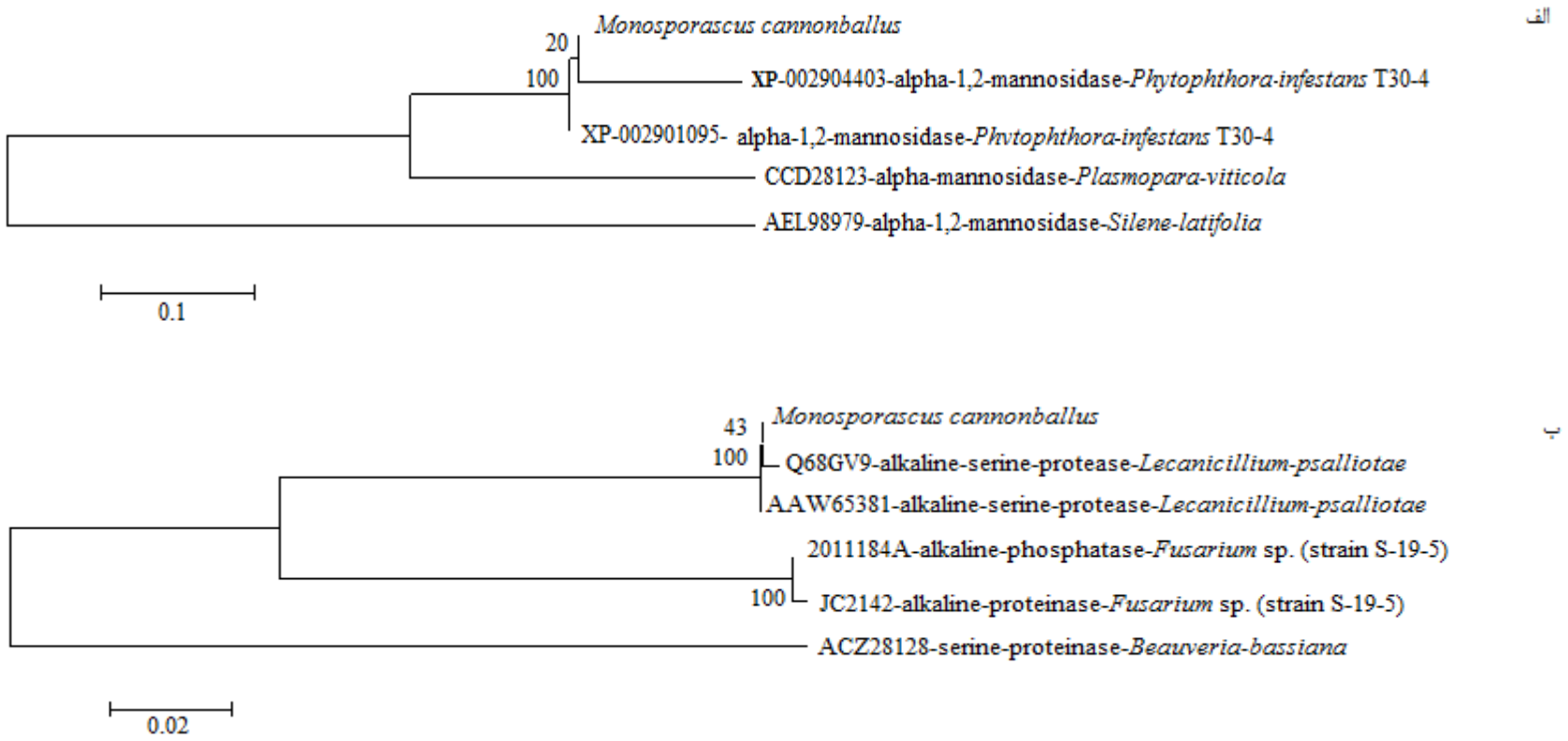
شکل۴-۵: نتایج Mass spectrometry باندهای ۲۶ و ۲۷ کیلودالتون. الف: Mass spectrometry باند ۲۷ کیلودالتون، ب: Mass spectrometry باند ۲۶ کیلودالتون، ج: MS/MS spectrum . به علت شباهت بسیار باندهای ۲۶ و ۲۷ کیلودالتون طبق نتایج Mass spectrometry، احتمالاً ایزوزیم‌های یک آنزیم هستند که با آنزیم سرین پروتئاز موجود در *Lecanicillium psalliotae* حدوداً ۶۹ درصد همولوژی دارند.

```
  1 mrlsiiaavl plalaapvae peiapliear gaqpiagkyi vklkdeakfg imnakskipg
 61 iervyenvln gfsatlsnee lerlrrdpdv esieqdaifs inaitqqqga twgltrishr
121 argstayayd tsagagacvy vidtgvedth pdfegrakqi ksyastardg hghgthcagt
181 igsktwgvak kvsifgvkvl ddsgsgslsn ivagmdfvas drqsrncprg tvasmslggg
241 ysaalnqaaa rlqssgvfva vaagndnrda antspasept vctvgatdsn dvrstfsnyg
301 rvvdifapgt sitstwiggr tntisgtsma tphiaglaay lfgleggsag amcgriqtls
361 tknvltsips gtvnylafng at
```

شکل۴-۶: توالی آنزیم serine protease شناسایی شده در قارچ *M. cannonballus* طبق نتایج توالی‌یابی از باندهای ۲۶ و ۲۷ کیلودالتون.

جدول۴-۱: آنزیم‌های مشابه به دست آمده از protein blast دو آنزیم آلفا-مانوزیداز و سرین پروتئاز

گونه	شماره دسترسی در بانک ژن	پروتئین
Phytophthora infestans T30-4	002901095	alpha-1,2-mannosidase
Phytophthora infestans T30-4	002904403	alpha-1,2-mannosidase
Plasmopara viticola	CCD28123	alpha-mannosidase
Silene latifolia	AEL98979	alpha-1,2-mannosidase
Lecanicillium psalliotae	AAW65381	alkaline serine protease
Lecanicillium psalliotae	Q68GV9	alkaline serine protease
Fusarium sp. (strain S-19-5)	2011184A	alkaline phosphatase
Fusarium sp. (strain S-19-5)	JC2142	alkaline proteinase
Beauveria bassiana	ACZ28128	serine proteinase



شکل۴-۷: دندروگرام فیلوژنی دو آنزیم alpha-1,2-mannosidase و serine protease. در دندروگرام فیلوژنی رسم شده مشاهده می‌شود که آنزیم alpha-1,2-mannosidase جداسازی شده از قارچ *M. cannonballus* شبیه به آنزیم alpha-1,2-mannosidase موجود در *Phytophthora infestans* (*T30-4*) (الف) و آنزیم serine protease جداسازی شده از این قارچ مشابه آنزیم serine protease موجود در *Lecanicillium psalliotae* می‌باشند (ب).

شکل۴-۸: بررسی تأثیر مواد با وزن مولکولی زیر ۱۰ کیلودالتون روی برگ‌های حقیقی و کوتیلدونی گیاه خربزه. برگ-های تزریق شده با آب مقطر و محیط کشت Czapeck's هیچ نوع علایمی نشان ندادند در صورتی‌که برگ‌های تزریق شده با مواد با وزن مولکولی پائین علایم نکروزیس را بروز دادند.

۴-۵- تأثیر دما روی فعالیت بیولوژیکی مواد با وزن مولکولی پائین

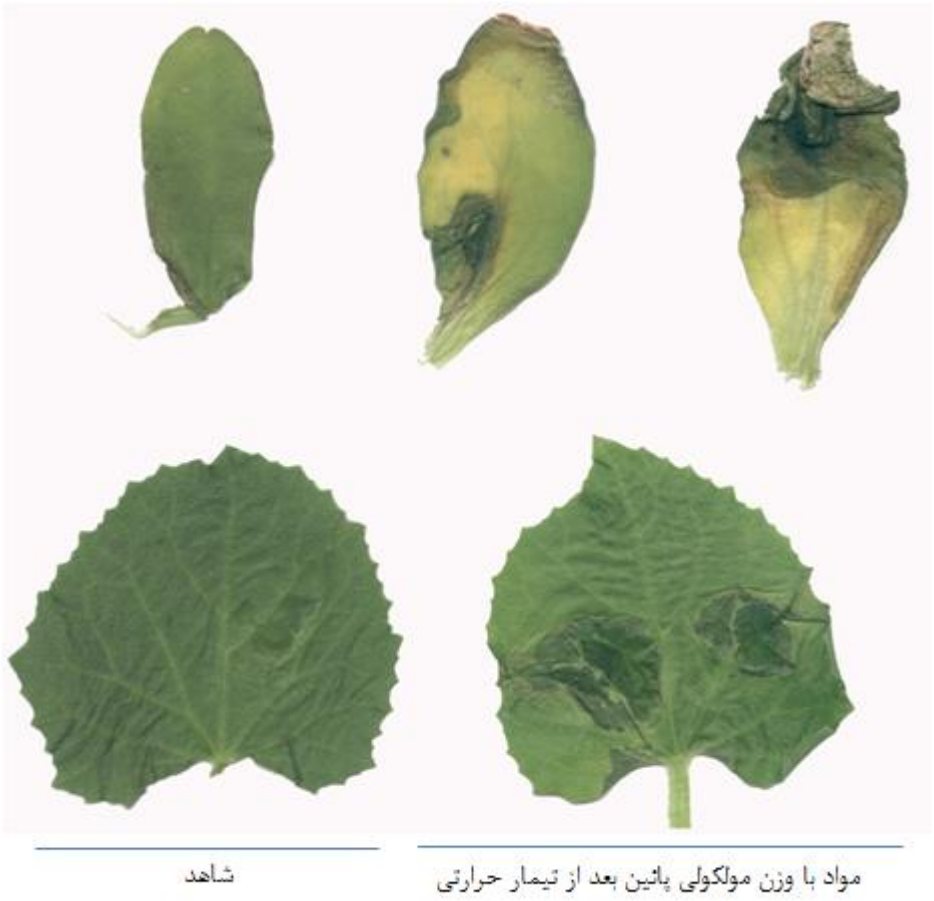
برگ‌های تزریق شده با Czapeck's، آب مقطر و مواد با وزن مولکولی پائین که با گرما (در ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد به مدت یک ساعت) تیمار شده بودند بعد از ۱۲۰ ساعت هیچ نوع علایمی بروز

ندادند و این نشان دهنده این بود که مواد با وزن مولکولی پائین فعالیت بیماری‌زایی خود را در اثر تیمار با گرما از دست نداده و احتمالاً ترکیبات متابولیتی هستند (شکل۴-۹).

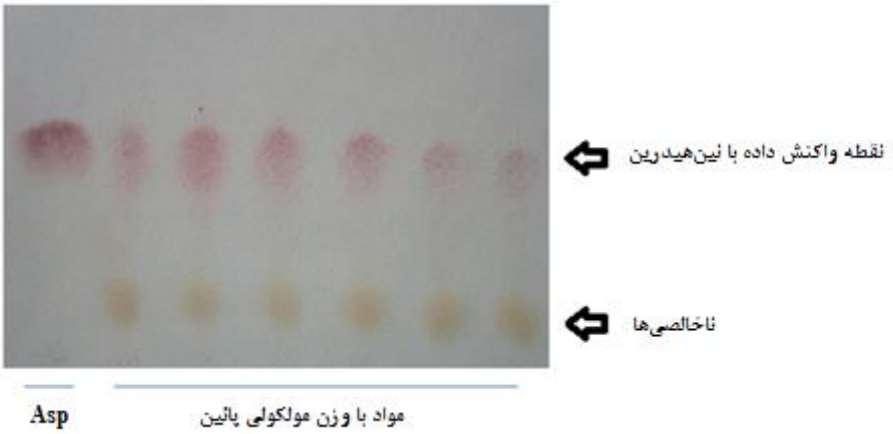
۴-۶- جداسازی مواد با وزن مولکولی پائین (LMWCs)

مواد با وزن مولکولی پائین به دست آمده از کشت قارچ *M. cannonballus* در محیط کشت Czapeck's روی الکتروفوتوگرام، تنها در یک نقطه با نین‌هیدرین واکنش مثبت نشان دادند که ماده-ای با وزن مولکولی پایین تقریباً برابر با جرم مولکولی اسید آسپارتیک بود (شکل۴-۱۰) و برای به دست آوردن مقدار کافی ماده خالص شده به منظور شناسایی آن، آزمایش HVPE حدود ۵۰ بار تحت شرایط یکسان ذکر شده صورت گرفت (صفحه ۴۷). سپس کاغذ شامل چندین نقطه مواد با وزن مولکولی پائین رنگ‌آمیزی نشده به یک نوار بر اساس موقعیت نقطه ظاهر شده در دو نوار کناری بریده شد. متابولیت (ماده با وزن مولکولی پائین) با استفاده از متانول به مدت ۵ دقیقه در دور g× ۶۰۰۰ سانتریفیوژ از کاغذها استخراج و سپس لیوفیلیزه[1] شد و برای اطمینان از صحت آن دوباره با مقداری از ماده خالص شده آزمایش HVPE صورت گرفت و وجود ماده مشاهده شد. به علت کوچک بودن بیش از اندازه این ماده توالی‌یابی و شناسایی آن امکان پذیر نبود. گمان می‌رود به علت واکنش رنگی آن با نین‌هیدرین، میزان حرکت نسبی آن در کاغذ (R_m = ۱)، فعالیت‌های بیولوژیکی از قبیل آب سوختگی طبق آزمایشات قبلی بر روی قارچ‌های دیگر، احتمالاً این ماده از ماراسمین‌ها[2] باشد (اسمدگارت، ۱۹۷۶، بچ و همکاران، ۱۹۷۹، فریز و همکاران، ۱۹۹۱، سرپله و همکاران، ۲۰۰۷). ماراسمین‌ها گروهی از ترکیبات فیتوتوکسینی (toxin A, toxin B, toxin C) هستند و روی دامنه وسیعی از گیاهان متفاوت ایجاد آب سوختگی، کلروزیس و نکروزیس می‌کنند و ماراسمین‌ها از طریق NMR و LC-MS شناسایی شده‌اند (استرنج، ۲۰۰۶).

1 - lyophilized
2 - marasmines



شکل۴-۹: بررسی تأثیر مواد با وزن مولکولی زیر ۱۰ کیلودالتون حرارت داده شده. تزریق مواد با وزن مولکولی زیر ۱۰ کیلودالتون به برگ‌های کوتیلدونی و حقیقی خربزه که در ۱۰۰ درجه به مدت ۱ ساعت تیمار شدند نشان داد که این مواد توسط حرارت غیرفعال نشده و خاصیت فیتوتوکسینی خود را از دست نداده‌اند.



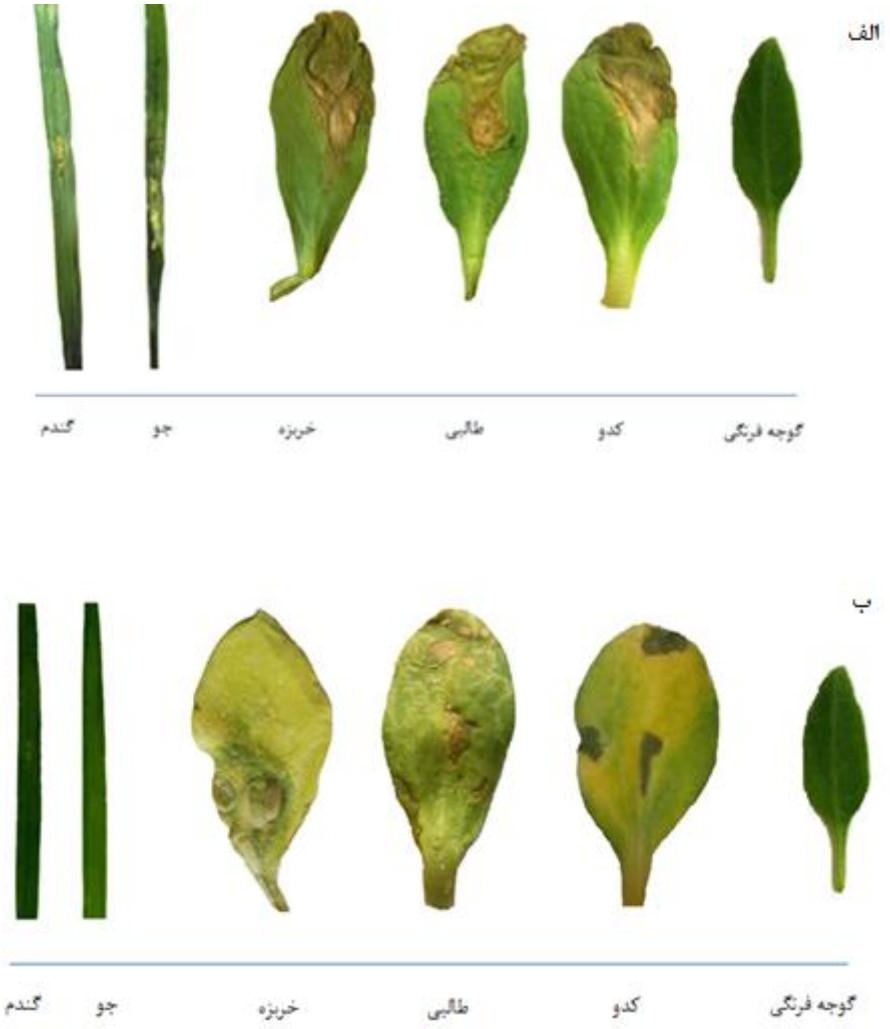
شکل۴-۱۰: HVPE مواد با وزن مولکولی زیر ۱۰ کیلودالتون. یک نقطه واکنش داده با نین‌هیدرین که در مقایسه با اسید اسپارتیک جرم مولکولی مشابه با آن را دارد مشاهده گردید.

۴-۷- اثبات اختصاصی و غیراختصاصی بودن مواد فیتوتوکسینی جداسازی شده

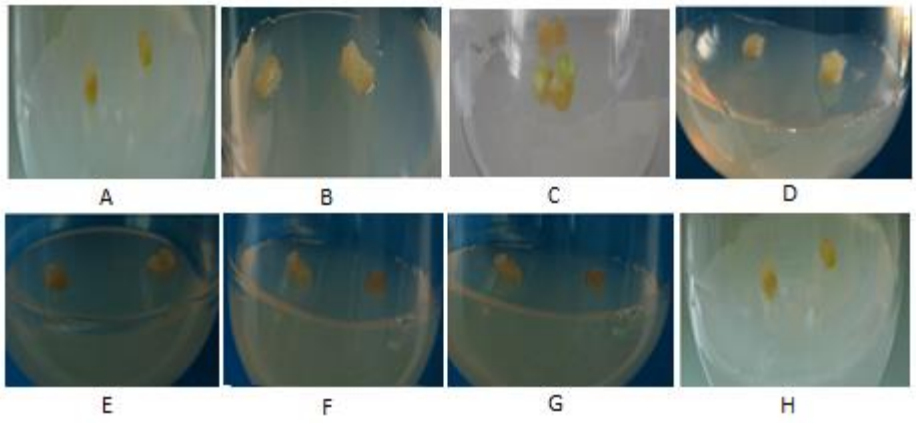
پس از گذشت ۱۲۰ ساعت مواد با وزن مولکولی پایین (حاصل از خالص سازی مقدماتی) روی برگ‌های گیاهان خربزه، کدو، طالبی، گندم و جو (شکل۴-۱۱ الف) و مواد با وزن مولکولی بالا (حاصل از خالص سازی مقدماتی) تنها روی گیاهان خانواده کدوئیان ایجاد علائم نکروزیس نمودند (شکل۴-۱۱ ب) و این آزمایش نشان داد که شاید مواد با وزن مولکولی پایین به علت بیماری‌زایی روی گندم و جو علاوه بر گیاهان خانواده کدوئیان بتوانند جز فیتوتوکسین‌های غیراختصاصی میزبان و مواد با وزن مولکولی بالا به علت خاصیت بیماری‌زایی تنها بر روی گیاهان خانواده کدوئیان جز فیتوتوکسین‌های اختصاصی میزبان به حساب آیند.

۴-۸- نتیجه کشت بافت گیاهان به منظور آنالیز تنوع سوماکلونال

طبق آزمایشات انجام شده به منظور دست‌یابی به پایه‌های مقاوم خربزه از طریق کشت بافت گیاهان خربزه در محیط‌های کشت MS همراه با غلظت‌های متفاوت هورمون‌های 2,4-D و BA و غلظت‌های متفاوت متابولیت‌های قارچی، پس از حدود ۷ هفته مشخص شد که در محیط کشت با BA (mg/l) ۰/۱، 2,4-D (mg/l) ۵ و عصاره قارچ ۰/۷ درصد مقدار کالوس‌زایی بیشتر است و در همین نوع محیط کشت با عصاره قارچ ۰/۵و ۰/۶درصد مقدار کالوس‌زایی کم و با عصاره ۰/۸، ۰/۹، ۱، ۱/۵ و ۲ درصد قارچ، کالوسی به وجود نیامد. پس با وجود این مشاهدات می‌توان در محیط کشت BA (mg/l) ۰/۱، 2,4-D (mg/l) ۵ و عصاره قارچ ۰/۷ درصد به گیاهان متحمل به قارچ *M. cannonballus* دست یافت (شکل۴-۱۲).



شکل۴-۱۱: بررسی اختصاصیت و غیراختصاصی بودن میزبانی تأثیر عصاره‌های قارچی با وزن مولکولی زیر ۱۰ کیلودالتون و بالای ۱۰ کیلودالتون. علایم نکروزه روی برگ‌های گندم، جو، خربزه، طالبی و کدو با تزریق LMWCs حاصل از خالص سازی مقدماتی بعد از ۱۲۰ ساعت مشاهده گردید (الف) اما علایم نکروزه با تزریق مواد با وزن مولکولی بالا حاصل از خالص سازی مقدماتی تنها روی برگ‌های خربزه، طالبی و کدو بعد از ۱۲۰ ساعت مشاهده گردید (ب).



شکل۴-۱۲: بررسی تأثیر غلظت‌های متفاوت هورمون‌های BA و 2,4-D و غلظت‌های متفاوت عصاره قارچی بر مقدار کالوس‌زایی. پس از حدود ۷ هفته مشخص شد که در محیط کشت با BA (mg/l)۰/۱، 2,4-D (mg/l) ۵ و عصاره قارچ ۰/۷ درصد مقدار کالوس‌زایی بیشتر است (C) و در همین نوع محیط کشت با عصاره قارچ ۰/۵و ۰/۶درصد مقدار کالوس‌زایی کم (A و B) و با عصاره ۰/۸، ۰/۹، ۱، ۱/۵ و ۲ درصد قارچ کالوسی به وجود نیامد (D، E، F، G و H).

فصل ۵:

بحث و پیشنهادات

یوکاریوت‌های زیان‌آور گیاهان از قبیل نماتدها، حشرات، علف‌های هرز، قارچ‌ها، اوومایست‌ها و دیگر بیمارگرها به علت حمله به گیاهان منجر به کاهش فاحش در محصولات کشاورزی و باغبانی می‌شوند و در حال حاضر سه استراتژی برای کنترل این موجودات زیان‌آور وجود دارد که استراتژی اول تناوب محصولات[1] است، به این صورت که رشد گیاهان میزبان و غیرمیزبان به صورت متناوب در یک مکان از طریق حذف میزبان‌ها و ایجاد تداخل در چرخه زندگی بیمارگرها باعث کاهش جمعیت آنها شود (اسچولت، ۱۹۹۲ و هانگ و همکاران، ۲۰۰۹). در خصوص قارچ *M. cannonballus* نیز تا کنون گزارشی از تناوب برای کنترل آن وجود ندارد و جا دارد این روش برای کنترل این قارچ در آینده مورد بررسی قرار گیرد. کنترل شیمیایی[2] روش مؤثر دیگری است و اگرچه دسترسی به نماتدکش‌ها، علف‌کش‌ها، حشره‌کش‌ها و قارچ‌کش‌ها آسان است اما به دلیل اثرات مضرشان برای آدمی و اکوسیستم میل به مصرف این مواد امروزه رو به کاهش گذاشته است (گتسینگر، ۱۹۹۸). ایجاد گیاهان مقاوم به بیمارگرها با استفاده از تنوع موجود و یا به کمک روش‌های مهندسی ژنتیک به وسیله دستکاری کردن ژن‌ها برای انتقال آنها به گیاهان استفاده شده است اما مشکل زمان‌بر بودن روش مرسوم تولید گیاهان مقاوم و همچنین کمبود ژن‌های مقاوم طبیعی است (جان های و همکاران، ۲۰۱۰). مجد و همکارانش (۱۹۹۹) انتقال ژن *δ-endotoxin* از باکتری *Bacillus thuringiensis* و تولید گیاهان تراریخته را انجام دادند و باعث تولید گیاهان مقاوم در برابر توکسین باکتری شدند. بیمارگر قارچی *Sclerotinia sclerotiorum* در سرتاسر جهان از طریق تولید فیتوتوکسین اگزالیک اسید باعث بیماری‌زایی بر روی بیشتر از ۴۰۰ محصول مانند آفتابگردان، کانولا و سویا می‌شود (هو و همکاران، ۲۰۰۳) اما محصولاتی مانند گندم و جو به علت دارا بودن آنزیم اگزالات اکسیداز (OXO) که باعث تجزیه و غیرسمی کردن فیتوتوکسین فوق می‌شود نسبت به این قارچ مقاومت نشان می‌دهند. در نتیجه با انتقال ژن *OXO* از گندم (gf-2.8) به آفتابگردان (هو و همکاران، ۲۰۰۳) و سویا (دونالدسون و همکاران، ۲۰۰۱) گیاهان تراریخته ایجاد شده نسبت به قارچ مقاومت نشان دادند و علایم بیماری از جمله پوسیدگی کمتر بروز کردند. این بررسی نشان داد که *M. cannonballus* قادر به تولید مواد فیتوتوکسینی (مانند آلفا- مانوزیداز و سرین پروتئاز) می‌باشد که احتمالاً در پروسه بیماری‌زایی دخیل هستند و با شناسایی ژن‌های این پروتئین‌ها (آلفا-

1 - crop rotation
2 - chemical control

مانوزیداز و سرین پروتئاز) و انتقال آنها به گیاه خربزه، در آینده می‌توان گیاهان تراریخته مقاوم و یا با حساسیت کمتر به این قارچ ایجاد نمود.

شناسایی و کشف ویژگی‌های بیوشیمیایی آنزیم‌های مؤثر در بیماری‌زایی در دانستن نقش آنها در واکنش بین میزبان- بیمارگر و ایجاد بیماری بسیار مهم است. دفاع گیاه علیه بیمارگرها فرآیندی پیچیده شامل فعال‌سازی یا سرکوبی مسیرهای سیگنالیگ متفاوتی است که منجر به بیان بیش از حد ژن‌های هدف با ویژگی‌های دفاعی می‌شوند. یکی از گروه‌های اصلی پروتئین‌های تولید شده بعد از حمله بیمارگرها مربوط به بازدارنده‌های پروتئازها می‌باشد (کاریلو و همکاران، ۲۰۱۱). بسیاری از میکروارگانیسم‌های بیمارگر گیاهی پروتئازهای خارج سلولی فعال را تولید می‌کنند که همراه با دیگر آنزیم‌ها مانند پلی‌گالاکتورونازها، پکتولیازها و زایلانازها نقش‌های مهمی در بیماری‌زایی مانند تجزیه کوتیکول دیواره سلولی و نفوذ میکروارگانیسم‌ها به داخل گیاه و همچنین غیرفعال سازی پروتئین‌های مرتبط با بیماری‌زایی (PR پروتئین‌ها مانند آنزیم‌های کیتیناز و β-1,3-glucanase) ایفا می‌کنند. در سال‌های اخیر بسیاری از پروتئازهای خارج سلولی تولید شده به وسیله میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا جداسازی و شناسایی شده‌اند و دسته‌بندی و نامگذاری این آنزیم‌های پروتئولیتیکی در پایگاه اطلاعاتی MEROPS (رااولینگز و همکاران، ۲۰۰۲) بر اساس شباهت‌های ساختاری توالی‌های اسید آمینه و مکانیسم کاتالیکی آنزیم‌ها صورت گرفته و فعالیت‌های آنها از طریق ABPP[1] نمایش داده شده است (کاسچانی و همکاران، ۲۰۱۲). پروتئازها آنزیم‌هایی هستند که سرعت هیدرولیز باندهای پپتیدی را افزایش می‌دهند و بر اساس نوع گروه کاتالیکی آنها به سرین پروتئازها، سیستئین پروتئازها، آسپارتات پروتئازها و متالوپروتئازها طبقه‌بندی می‌شوند. به عنوان مثال، باکتری عامل کلروزیس نقطه‌ای مرکبات (*Xylella fastidiosa*) سرین و متالو پروتئازها (ماریا- فداتو و همکاران، ۲۰۰۶)، قارچ *Magnaporthe grisea* سرین پروتئازها (دونوفریو و همکاران، ۲۰۰۶) و باکتری عامل پژمردگی و شانکر گوجه فرنگی*Clavibacter michiganensis* subsp. *Michiganismsis-tomato* سرین پروتئازها

1 - activity-based protein profiling

(استورک و همکاران، ۲۰۰۸ و ساویدور و همکاران، ۲۰۱۲) را ترشح می‌کنند و نقش مهمی در بیماری‌زایی دارند.

بر طبق نتایج توالی‌یابی یکی از آنزیم‌های ترشحی از قارچ *M. cannonballus* سرین پروتئاز می‌باشد. سرین پروتئازها یکی از بزرگترین خانواده‌های پروتئازها را تشکیل می‌دهند و شامل آنزیم‌هایی مانند trypsin، chymotrypsin، elastase، subtilisin، protease A,B و غیره می‌باشند. جایگاه فعال سرین پروتئازها شامل سه اسید آمینه سرین، هیستیدین و آسپارتات است و به علت واکنش سرین با سوبسترا در جایگاه فعال، سرین پروتئاز نامیده شده است. مکانیسم عمل سرین پروتئازها به این صورت است که، گروه کربوکسیل آسپارتات با هیستیدین، باندهای هیدروژنی تشکیل می‌دهد و باعث الکترونگاتیو شدن هیستیدین می‌شود و در نتیجه یک جفت الکترون موجود روی نیتروژن هیستیدین، هیدروژن گروه هیدروکسیل سرین را جذب و سرین بار منفی پیدا می‌کند و به باند پپتیدی موجود در سوبسترا (پروتئین) حمله کرده و باعث تجزیه شدن پیوند پپتیدی می‌شود (هداستروم، ۲۰۰۲). بسیاری از قارچ‌های مهم رشته‌ای و دیگر میکروارگانیسم‌ها، سرین پروتئاز subtilisin را کد می‌کنند که در هم‌زیستی آنها با درختچه‌های علفی و در پارازیته کردن حشرات، نماتدها، گیاهان و قارچ‌ها به آنها کمک می‌کند (ماسزوسکا و همکاران، ۲۰۱۱). به عنوان مثال سه گونه از Pythium شامل *P. insidiosum*، *P. graminicola* و *P. grandisporangium* سرین پروتئاز subtilisin را ترشح می‌کنند (دیویس و همکاران، ۲۰۰۶). این آنزیم با فعالیت پپتیدازی خود یکی از اجزای مهم مواد مترشحه قارچی محسوب می‌شوند. سرین پروتئاز شناسایی شده از قارچ *M. cannonballus* مشابه آنزیم سرین پروتئاز subtilisin قارچ نماتدخوار *Lecanicillium psallitae* می‌باشد و به این ترتیب می‌توان احتمال داد که وجود این آنزیم در قارچ *M. cannonballus* سبب تجزیه شدن کوتیکول دیواره سلولی و نفوذ قارچ به داخل گیاه می‌شود. طبق منابع موجود سرین پروتئاز ترشح شده از *Phytophthora infestans* عامل بادزدگی گوجه فرنگی نیز به عنوان توکسین شناسایی شده است، به طوری که بازدارنده‌های سرین پروتئاز EPI1 و EPI10 تولید شده از اوومایست *P. infestans* باعث بازدارندگی فعالیت پروتئاز

دفاعی تولیدی گیاه (سرین پروتئاز subtilisin P69B که جزء PR پروتئین‌های آپوپلاستی گوجه فرنگی محسوب می‌شود) شده و از این طریق باعث سرکوبی پاسخ‌های دفاعی گیاه گوجه فرنگی و بیماری بادزدگی آن می‌شود (تیان، ۲۰۰۵).

از دیگر آنزیم‌های شناسایی شده از قارچ *M. cannonballus* در این تحقیق آنزیم α-1,2-mannosidase بود. آنزیم‌های mannosidase به دو صورت α-1,2-mannosidase (موجود در شبکه آندوپلاسمی و جزء خانواده ۴۷ گلیکوزید هیدرولازها (GH47) و β-mannosidase (موجود در گلژی، جز آنزیم‌های GH2) وجود دارند. شبکه آندوپلاسمی مکانی است که تغییرات نهایی روی پروتئین‌ها انجام می‌شود و سرانجام پروتئین‌ها را برای وارد شدن به جایگاه‌های اختصاصی عملکردشان وارد مسیر ترشحی می‌کند و یا پروتئین‌های ناقص[1] را برای تجزیه به سمت سیتوسل میفرستد. گلیکوزیلاسیون پروتئین‌ها یکی از تغییرات پس از ترجمه است که روی پروتئین‌ها صورت می‌گیرد و سپس گلیکوپروتئین درون شبکه آندوپلاسمی تحت تأثیر آنزیم α-1,2-mannosidase قرار می‌گیرند و زنجیره قندی Glc_3-Man_9-$GluNAc_2$ تبدیل به Glc_3-Man_5-$GluNAc_2$ می‌شود. به این ترتیب نقش α-1,2-mannosidase موجود در شبکه آندوپلاسمی تجزیه پیوندهای α-1,2 مانوز می‌باشد. β-mannosidase ها آنزیم‌هایی هستند که تنها باعث تجزیه یک پیوند α-1,2 مانوز می‌شوند و زنجیره قندی Glc_3-Man_9-$GluNAc_2$ را تبدیل به Glc_3-Man_8-$GluNAc_2$ می‌کنند.

تا کنون گزارشی از چگونگی مکانیسم بیماری‌زایی α-1,2-mannosidase های ترشحی از بیمارگرها در دسترس نمی‌باشد. به طوری که یکی از آنزیم‌های α-1,2-mannosidase ترشحی قارچ *Magnaporthe oryzae* عامل بلاست به نام MGG-00994.6 مورد بررسی قرار گرفت و مشخص گردید که پلی‌پپتید بالغ آن یک گلیکوپروتئین است که قادر به تجزیه پیوندهای α-1,2 مانوز می‌باشد اما با حذف این ژن تغییری روی بیماری‌زایی مشاهده نشد (زو و همکاران، ۲۰۰۹).

1 – misfolded

لازم به ذکر است که موجودات تولید کننده توکسین خودشان از اثرات سمی ترکیبات توکسینی که تولید می‌کنند در امان هستند به طور مثال Trichothecenes توکسین‌های تولید شده توسط گونه-های فوزاریوم هستند که اثرات بازدارندگی روی سلول‌های یوکاریوتی مانند جلوگیری از سنتز پروتئین، DNA و RNA همچنین بازدارندگی فعالیت میتوکندری، تقسیم سلولی و تخریب غشاها دارند (روچا و همکاران، ۲۰۰۵). ژن *TriL2* پمپی را کد می‌کند و مانع از تأثیر توکسین‌ها بر روی خود قارچ فوزاریوم می‌شود (الکساندر و همکاران، ۱۹۹۹) و ژنی با ویژگی‌های مشابه به ژن *TriL2* در *Helminthosporium carbonum* که تولید کننده توکسین HC است به نام TOXA یافت شده است (پیتکین و همکاران، ۱۹۹۶). بنابر این می‌توان طی بررسی‌هایی در آینده ژن و یا ژن‌هایی در قارچ *M. cannonballus* کشف کرد که باعث محافظت قارچ از اثرات سمی توکسین‌های تولید شده می‌شوند و با انتقال این ژن و یا ژن‌ها به گیاه خربزه گیاهان تراریخته مقاوم به این قارچ تولید نمود و یا از طریق مهندسی ژنتیک کاری نمود که این محافظت شخصی در قارچ از بین برود به طوری که با استفاده از RNA silencing می‌توان باعث خاموشی ژن یا ژن‌های محافظت کننده از قارچ در برابر توکسین شد.

متأسفانه به دلیل ناپایداری گیاهان تراریخته در طبیعت به علت تکامل مانند از بین رفتن تدریجی مقاومت گیاهان تراریخته با توکسین Bt در مقابل حشرات مقاوم (بااوم و همکاران، ۲۰۰۷ و ماو و همکاران، ۲۰۰۷)، روش کنترل با مهندسی ژنتیک گیاهان نیاز به توسعه بیشتر و ایجاد گیاهان پایدارتر دارد. در این خصوص تکنولوژی RNA interference (RNAi) یا RNA silencing به عنوان یک ابزار ژنتیکی جایگزین برای توسعه بیمارگرهای غیربیماری‌زا و گیاهان مقاوم به بیمارگر به کار گرفته شده است. RNAi یک مکانیسم تنظیم بیان ژن‌ها می‌باشد (وچرت، ۲۰۰۶) و این فرآیند توسط مولکول‌های دو رشته‌ای RNA به نام مولکول‌های RNA مداخله‌گر کوچک siRNA انجام می‌شود که باعث خاموشی ژن از طریق تجزیه mRNA ها (قبل از ترجمه) و مانع سنتز پروتئین می‌گردد و جهت

حفاظت ژنوم در مقابل تهدیدات ژن‌های با منشاء خارجی (قارچ‌ها، ویروس‌ها و ...) و همچنین ژن‌های با منشاء داخلی (نظیر ترانسپوزون‌ها) به کار می‌رود (راجکیشور و همکاران، ۲۰۱۱).

می‌توان با القاء مکانیسم RNAi در گیاه میزبان گیاهان مقاوم به بیمارگر تولید نمود. برای ایجاد این مکانیسم در گیاه و خاموش کردن ژن مدنظر (ژن بیماری‌زای ورودی از بیمارگر) می‌توان با استفاده از انتقال ویروس و یا پلاسمیدی که حاوی ژن هدف هستند به گیاه این کار را انجام داد (لو و همکاران، ۲۰۰۳). همچنین می‌توان از طریق تغییر ژنتیکی جنین‌ها و یا کالوس‌های گیاه با یک وکتور شامل ساختار سنجاق سری sense-linker-antisense با قطعه ژن مورد نظر از بیمارگر که منجر به تولید dsRNA از توالی خاص بیمارگر می‌شوند، نیز ایجاد مکانیسم خاموشی ژن در میزبان کرد و هنگامی که بیمارگر به میزبان حمله می‌کند با استفاده از سیستم RNAi القاء شده با ژن بیماری‌زا (ژن هدف) مبارزه کند و باعث سرکوب شدن آن شود (کاترین، ۲۰۰۹). به عنوان مثال ژن *CTB2* سنتز کننده آنزیم *O*-methyl transferase می‌باشد که درگیر در سنتز توکسین cercosporin در قارچ *Cercospora beticola* است و توسط کورنلیا (۲۰۱۱) از این قارچ جدا گردید و در پلاسمید کلون و به گیاه چغندرقند (*Beta vulgaris*) انتقال داده شد تا چغندرقند بتواند توسط مکانیسم RNAi القاء شده در برابر توکسین cercosporin تولیدی از قارچ *C. beticola* مقاومت نشان دهد.

در مورد قارچ *M. cannonballus* نیز می‌توان با القاء مکانیسم RNAi در گیاه خربزه به وسیله انتقال ژن‌های شناسایی شده سرین پروتئاز و مانوزیداز به داخل گیاه، گیاهان مقاوم تولید کرد به طوری که هنگام حمله قارچ به گیاه تراریخته مکانیسم فعال و باعث خاموشی این ژن‌ها و بالطبع کاهش بیماری-زایی گردد.

نکته جالب دیگر که در فصل دوم نیز همراه با مثال به آن اشاره گردید، سمی بودن بعضی توکسین‌ها برای علف‌های هرز و در نتیجه استفاده از توکسین‌ها به منظور کنترل آنها می‌باشد (اباس و همکاران، ۱۹۹۱). به طور مثال در آزمایشی از فیتوتوکسین‌های تولید شده توسط *Colletotrichum*

dematium FGCC# 20 برای کنترل علف هرز *Parthenium hysterophorus* L. استفاده شد به طوری که ابتدا متابولیت‌های این قارچ همانند روش تهیه متابولیت‌های قارچ *M. cannonballus* تهیه شدند و سپس روی برگ‌های جدا شده، گیاهچه‌ها و بذور گیاه *Parthenium hysterophorus* L. آزمایش شدند و نشان داده شد که فیتوتوکسین‌های *C. dematium* FGCC# 20 باعث ایجاد علائم آنتراکنوز روی برگ‌ها، رشد کم گیاهچه‌ها و جوانه‌زنی کم بذور علف هرز مذکور می‌شوند و به این ترتیب استفاده از فیتوتوکسین‌های قارچ *C. dematium* FGCC# 20 می‌تواند در کنترل این علف هرز مؤثر واقع شود (سینگ و همکاران، ۲۰۱۰). با توجه به این نکته با بررسی توکسین‌های قارچ *M. cannonballus* بر روی علف‌های هرز مختلف شاید بتوان در کنترل بعضی از علف‌های هرز از آنها استفاده کرد.

با توجه به توضیحات داده شده در فصل دوم، می‌توان از دیگر ارگانیسم‌ها به عنوان عوامل بیوکنترلی در کنترل ارگانیسم‌های تولید کننده توکسین استفاده کرد و همچنین با شناسایی و انتقال ژن‌های مسئول تخریب توکسین در ارگانیسم (که به عنوان عامل بیوکنترلی محسوب می‌شود) به گیاه میزبان گیاهان مقاوم تولید کرد. به طور مثال آفلاتوکسین توکسینی است که توسط *Aspergillus flavus* تولید می‌شود و نمی‌توان به طور کامل مانع از سنتز آن شد و باید از یک روش کنترل بیولوژیکی توسعه یافته استفاده کرد تا با کاهش محتوی توکسین، سلامتی محصولات را تضمین کرد. در آزمایشی اثبات شد که از همزیستی باکتری *Bacillus subtilis* با قارچ آسپرژیلوس به علت تولید اسید لاکتیک از باکتری *B. subtilis* مقدار آفلاتوکسین تولیدی توسط آسپرژیلوس کاهش می‌یابد (رویکیان و همکاران، ۲۰۰۷). به منظور کنترل قارچ *M. cannonballus* نیز می‌توان این راهکار را پیشنهاد کرد و همچنین با شناسایی و انتقال ژن‌های تخریب توکسین‌ها در ارگانیسم عامل بیوکنترلی *M. cannonballus* به داخل گیاهان خربزه، گیاهان تراریخته مقاوم تولید نمود.

طبق نتایج مشاهده شده از نقش فیتوتوکسین‌ها در بیماری‌زایی و ارتباط بین مقاومت و حساسیت میزبان به بیمارگر گیاهی خاص و فیتوتوکسین تولیدی از آن، می‌توان از فیتوتوکسین‌ها به عنوان عوامل انتخابی در ایجاد یک سیستم غربال‌گری آزمایشگاهی موفقیت‌آمیز در تولید گیاهان مقاوم استفاده کرد (کارلسون، ۱۹۷۳). به عنوان مثال آزمایشات بر روی oilseed rape نشان داد که لاین-های متحمل به توکسین sirodespin PL تولید شده توسط قارچ *Leptosphaeria maculans* متحمل‌تر و مقاوم‌تر به بیماری هستند (بویاتی و اینگرم، ۱۹۹۱). تاکنون کاربرد فیتوتوکسین‌ها و محیط کشت‌های حاوی فیتوتوکسین از بیمارگرهای گیاهی در ترکیب با تکنیک کشت بافت به طور موفقیت‌آمیز در به دست آوردن لاین‌هایی مقاوم از محصولات موز، گندم، تنباکو و انگور نتیجه بخش بوده است (اسلاوو، ۲۰۰۵) و بررسی انجام شده در این تحقیق روی فیتوتوکسین‌های قارچ *M. cannonballus* و کشت بافت گیاهان خربزه تا این مرحله اثبات کرد که ریزنمونه‌های هیپوکوتیکول تنها با غلظت ۰/۷ درصد فیتوتوکسین قارچ ایجاد کالوس‌های متحمل به فیتوتوکسین می‌کنند و در آینده با باززا کردن گیاهان حاصل از این کالوس‌های متحمل می‌توان گیاهان مقاوم و یا گیاهان با حساسیت کمتر نسبت به این قارچ ایجاد کرد.

ضمائم

ضمیمه۱- محیط کشت FCM و اجزاء آن

جدول ۱: محیط کشت FCM

ماده شیمیایی	مقدار (میلی‌مولار)
فسفات دی هیدروژن پتاسیم	۷
سولفات منیزیم ($MgSO_4, 7\ H_2O$)	۲
کلرید سریم	۱
کلرید کلسیم	۱
سولفات منگنز ($MnSO_4, 4\ H_2O$)	۰/۴
اسید بوریک	۰/۱۶
سولفات مس ($CuSO_4, 5\ H_2O$)	۰/۰۰۴
سولفات روی ($ZnSO_4, 7\ H_2O$)	۰/۰۰۳
سولفات آهن ($FeSO_4, 7\ H_2O$)	۰/۰۰۷۱
آمونیوم نیترات	۰/۰۰۱۲
دی آمونیوم تارتریت $(NH_4)_2C_4H_4O_6$	۰/۰۲۷
گلوکز	۰/۱۶

ضمیمه ۲- محیط کشت Czapeck's و اجزاء آن

جدول ۲: محیط کشت Czapeck's

ماده شیمیایی	مقدار (Gms/Litre)
ساکارز	۳۰۰۰۰
نیترات سدیم	۳۰۰۰
فسفات دی‌پتاسیم	۱۰۰۰
سولفات مگنزیم	۰/۵
کلرید پتاسیم	۰/۵
سولفات آهن	۰/۰۱

ضمیمه ۳- چگونگی غلظت سنجی پروتئین به روش برادفورد

سنجش میزان پروتئین به روش برادفورد: سنجش برادفورد روشی سریع، قابل اطمینان و متکی به رنگ برای تعیین میزان کمی پروتئین در یک محلول می‌باشد (برادفورد، ۱۹۷۶).

۱. تهیه معرف برادفورد

۰/۰۵ گرم کوماسی بلو G-250 + ۲۵ میلی‌لیتر اتانول ۹۶ درصد

↓

قرار دادن روی stirrer به مدت ۲ ساعت

↓

اضافه کردن ۵۰ میلی‌لیتر ارتوفسفریک اسید ۸۵ درصد

↓

قرار دادن روی stirrer به مدت یک شب

↓

با آب مقطر به حجم ۵۰۰ میلی‌لیتر می‌رسانیم

↓

صاف کردن توسط کاغذ صافی و قرار دادن در یخچال

۲. تهیه محلول‌های استاندارد و رسم منحنی استاندارد

یک میلی‌گرم سرم آلبومین گاوی (BSA) را با آب مقطر به حجم یک میلی‌لیتر می‌رسانیم. استوک ۰/۱ درصد آلبومین به دست می‌آید. از این استوک ۴ رقت متفاوت تهیه می‌کنیم:

- ۰/۵ ml از استوک ۱۰۰۰ µg/ml + ۲ میلی‌لیتر آب مقطر ← استوک ۲۰۰ µg/ml
- ۱ ml از استوک ۱۰۰۰ µg/ml + ۱/۵ میلی‌لیتر آب مقطر ← استوک ۴۰۰ µg/ml
- ۱/۵ ml از استوک ۱۰۰۰ µg/ml + ۱ میلی‌لیتر آب مقطر ← استوک ۶۰۰ µg/ml
- ۱ ml از استوک ۱۰۰۰ µg/ml + ۰/۲۵ میلی‌لیتر آب مقطر ← استوک ۸۰۰ µg/ml

برای تهیه منحنی استاندارد ۵ محلول استاندارد به صورت زیر تهیه می‌کنیم:

استاندارد ۱- ۱۰۰ µl از رقت ۲۰۰ µg/ml + ۵ µl معرف برادفورد

استاندارد ۲- ۱۰۰ µl از رقت ۴۰۰ µg/ml + ۵ µl معرف برادفورد

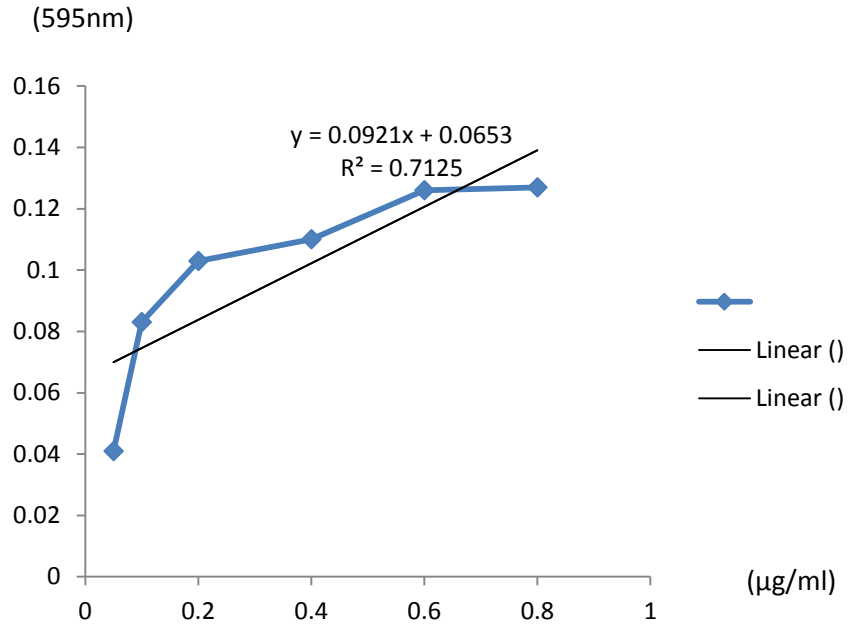
استاندارد ۳- ۱۰۰ µl از رقت ۶۰۰ µg/ml + ۵ µl معرف برادفورد

استاندارد ۴- ۱۰۰ µl از رقت ۸۰۰ µg/ml + ۵ µl معرف برادفورد

استاندارد ۵- ۱۰۰ µl از رقت ۱۰۰۰ µg/ml + ۵ µl معرف برادفورد

برای دقت کار از هر استاندارد ۳ نمونه تهیه شد که به مدت ۱۵ تا ۲۰ دقیقه در دمای آزمایشگاه باقی ماند. یک نمونه شاهد هم شامل ۱۰۰ µl آب مقطر و ۵ µl معرف برادفورد تهیه شد که باید ۱۵ تا ۲۰ دقیقه در دمای آزمایشگاه باقی می‌ماند. سپس با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر (Pharmacia LKB.Ultrospec) بعد از صفر کردن دستگاه توسط نمونه شاهد، جذب استانداردها را در طول موج ۵۹۵ نانومتر مشخص و منحنی استاندارد رسم گردید.

با رسم منحنی استاندارد (شکل۱) از داده‌های به دست آمده فرمولی به دست آمد که با قرار دادن میانگین جذب نمونه (۰/۰۸۲) در آن غلظت پروتئین حاصله معادل ۱۸۴ µg/ml/. تعیین شد.



شکل ۱: منحنی استاندارد

منابع

پوستچی ا، (۱۳۵۰) **"جالیز و جالیز کاری"**، موسسه انتشارات فرانکلین، ص ۳۳۰.

سرپله ا. و سنبل کار ا.، (۱۳۸۱) "جداسازی *Monosporascus cannonballus* از طالبی و خربزه در ایران" **پانزدهمین کنگره گیاهپزشکی ایران**، ص ۱۸۵، کرج.

شریف ق ، نیمان ا ، دهیار خ و شیرزادی غ، (۱۳۴۶) **"بیماری لکه قهوه‌ای گوشت میوه خربزه یا بوته-میری خربزه ایوانکی"**، ص ۳۷-۱.

مبلی م و پیراسته ب، (۱۳۷۷) **"تولید سبزی"** انتشارات جهاد دانشگاهی دانشگاه اصفهان، ص ۴۰.

Abbas H. K., Boyette C. D., Hoagland R. E. and Vesonder R. F. (1991) "Bioherbicidal potential of *Fusarium moniliforme* and its phytotoxin, fumonisin" **J. of. Weed Science**, 39, pp 673-677.

Abbas H. K., Tanaka T., Duke S. O., Porter J. K. and Wray E. M. (1994) "Fumonisin and sphingolipid metabolism with accumulation of free sphingoid bases" **J. of. Plant Physiology**, 106, pp 1085-1093.

Aducci P., Ballio A., Focliano V., Fullone M. R., Marra M. and Nasta D. (1996) "Resistenza alle fltotossine: perdita di recettori specific?" **J. of. Plant Pathol.**, 6, pp 81-85.

Aegerter B. J., Gordon T. R. and Davis R. M. (2000) "Occurrence and pathogenicity of fungi associated with melon root rot and vine decline in California" **J. of. Plant Disease**, 84, pp 224-230.

Agrios G. N. (2005), "**Plant Pathology**", Vol. 1, Academic Press, New York. 5, pp 633.

Ahn J. H. and Walton J. D. (1998) "Regulation of cyclic peptide biosynthesis and pathogenicity in Cochliobolus carbonum by TOXEp, a novel protein with a bZIP basic DNA-binding motif and four ankyrin repeats" **J. of. Mol. Gen. Genet**., 260, pp 462-469.

Alexander N. J., Mccormick S. P. and Hohn T. M. (1999) "*TriL2*, a trichothecene efflux pump from *Fusarium sporotrichioides*: gene isolation and expression in yeast" **J. of. Mol. Gen. Genet**., 261, pp 977-984.

Alfaro-Garcia A., Armengol J., Bruton B. D., Gams W., Garcia-Jimenez J. and Martinez-Ferrer G. (1996) "The taxonomic position of the causal agent of Acremonium collapse of muskmelon" **J. of. Mycologia**, 88, pp 804-808.

Alice C. L., Larry D. D., Walter S., Kevin J. K. and Vlado M. (2001) "Differential synthesis of peritoxins and precursors by pathogenic strains of the fungus *Periconia circinata*" **J. of. Applied and Environmental Microbiology**, 67, pp 5721-5728.

Asai T., Stone J. M., Heard J. E., Kovtun Y. and Yorgey P. (2000) "Fumonisin B1induced cell death in Arabidopsis protoplasts requires jasmonate, ethylene, and salicylate-dependent signaling pathways" **J. of. Plant Cell**, 12, pp 1823-1835.

Ayer W. A. and Pena-Rodriguez L. M. (1987) "Metabolites produced by *Alternaria brassicae*, the black spot pathogen of canola. 1. The phytotoxic components" **J. of. Natural Products**, 50, pp 400-407.

Ballance G. M., Lamari L., Kowatsch R. and Bernier C. (1996) "Cloning, expression and occurrence of the gene encoding the Ptr necrosis toxin from *Pyrenophora tritici-repentis*" **J. of. Mol. Plant. Pathol.**, **OnLine Publ. no. 1996/1209ballance**.

Ballio A. and Graniti A. (1991) "Multi-author Review. Phytotoxins and their involvement in plant diseases" **J. of. Experientia**, 47, pp 751-826.

Barrow K. D., Barton D. H. R., Chain E., Ohnsorge U. F. W. and Thomas R. (1971) "The constitution of fusicoccin" **J. of. Chem. Soc.**, pp 1265-1274.

Baum J. A., Bogaert T., Clinton W., Heck G. R., Feldmann P., Illagan O., Johnson S., Plaetinck G., Munyikwa T. and Pleau M. (2007) "Control of coleopteran insect pests through RNA interference" **J. of. Nat. Biotechnol.**, 25, pp 1322-1326.

Bobylev M., Bobyleva L. I. and Strobel G. A. (1996) "Synthesis and bioactivity of analogs of maculosin, a host-specific phytotoxin produced by *Alternaria alternata* on spotted knapweed (*Centaurea maculosa*)" **J. of. Agric. Food Chem.**, 44, pp 3960-3964.

Bos L. and Parlevliet J. E. (1995) "Concepts and terminology on plant/pest relationships: toward consensus in plant pathology and crop protection" **J. of. Phytopathology**, 33, pp 69-102.

Bradford M. M. (1976) "A dye binding assay for protein" **J. of. Biochem.**, 72, pp 248-254.

Brandwagt B. (2001) "Resistance of Plants to the Fungal Pathogen *Alternaria alternata* f.sp. *lycopersici*—discovery of a novel type of plant disease resistance gene" **Wageningen: Ponsen Looijen**, pp 112.

Briquet M., Vilret D., Goblet P., Mesa M. and Eloy M. C. (1998) "Plant cell membranes as biochemical targets of the phytotoxin helminthosporol" **J. of. Bioenerg. Biomembr**., 30, 3, pp 285-295.

Brooks D. M., Hernandez-Guzman G., Kloek A. P., Alarcon-Chaidez F., Sreedharan A., Rangaswamy V., Penaloza-Vazquez A., Bender C. L. and Kunkel B. N. (2004) "Identification and characterization of a well-defined series of coronatine biosynthetic mutants of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000" **J. of. Mol. Plant-Microbe Interact.**, 17, pp 162-174.

Bruton B. D., Davis R. M. and Gordon T. R. (1995) "Occurrence of *Acremonium* sp. and *Monosporascus cannonballus* in the major cantaloupe and watermelon growing areas of California" **J. of. Plant Disease**, 79, pp 754.

Bruton B. D. and Miller M. E. (1997) "Occurrence of vine decline diseases of melons in Honduras" **J. of. Plant Disease**, 81, pp 696.

Bruton B. D., Garcia-Jimenez J. and Armengol J. (2000) "Assessment of virulence of *Acremonium cucurbitacearum* and *Monosporascus cannonballus* on *Cucumis melo*" **J. of. Plant disease**, 84, pp 907-913.

Buiatti M. and Ingrem D. S. (1991) "Phytotoxins as tools in breeding and selection of disease-resistant plants" **J. of. Experientia**, 47, pp 811-819.

Carlson P. (1973) "Methionine-resistant mutants of Tobacco" **J. of. Science**, 180, pp 1366-1368.

Carrillo L., Herrero L., Cambra L., Sánchez-Monge R., Diaz I. and Martínez M. (2011) "Differential in vitro and in vivo effect of barley cysteine and serine protease inhibitors on phytopathogenic microorganisms" **J. of. Plant Physiol. Biochem.**, 49, 10, pp 1191-1200.

Cohen R., Elkind Y., Burger Y., Offenbach R. and Nerson H. (1996) "Variation in the response of melon genotypes to sudden wilt" **J. of. Euphytica**, 87, pp 91-95.

Cohen R., Pivonia S., Burger Y., Edelstein M., Gamliel A. and Katan J. (2000) "Towards intergrated management of Monosporascus wilt of melon in Israel" **J. of. Plant Disease**, 84, pp 496-505.

Collmer A. (1998) "Determinants of pathogenicity and avirulence in plant pathogenic bacteria." **J. of.** Curr Opin **Plant Biol.**, 1, pp 329-335.

Cornelia S., (2011), PhD. Thesis, "Host induced gene Silencing - strategies for the improvement of resistance against *Cercospora beticola* in sugar beet (*B. vulgaris* L.) and against *Fusarium graminearum* in wheat (*T. aestivum* L.) and maize (*Z. mays* L.) ", Mathematics, Informatics and Natural Sciences, Hamburg university,

Cotty P. J., Misaghi I. J. and Hine R. B. (1983) "Production of zinniol by *Alternaria tagetica* and its phytotoxic effect on *Tagetes erecta*" **J. of. Phytopathology,** 73, pp 1326-1328.

Davis D. J., Lanter K., Makselan S., Bonati C., Asbrock P., Ravishankar J. P. and Money N. P. (2006) "Relationship between temperature optima and secreted protease activities of three Pythium species and pathogenicity toward plant and animal hosts" **J. of. Mycological Research**, pp 96-103.

Dewit P. J. M. (1992) "Molecular characterization of gene-for-gene systems in plant-fungus interaction and the application of avirulence genes in control of plant pathogens" **J. of. Phytopathology**, 30, pp 391-418.

Donaldson P. A., Anderson T., Lane B. G., Davidson A. L. and Simmonds D. H. (2001) "Soybean plants expressing an active oligomeric oxalate oxidase from the wheat *gf-2.8* (germin) gene are resistant to the oxalate-secreting pathogen *Sclerotina sclerotiorum*" **J. of. Physiol. Mol. Plant Pathol**, 59, pp 297-307.

Donofrio N. M., Oh Y., Lundy R., Pan H., Brown D. E., Jeong J. S., Coughlan S., Mitchell T. K. and Dean R. A. (2006) "Global gene expression during nitrogen starvation in the rice blast fungus, *Magnaporthe grisea*" **J. of. Fungal Genet. Biol.**, 43, 9, pp 605-617.

Durner J. and Klessig D. F. (1995) "Inhibition of ascorbate peroxidase by salicylic acid and 2,6-dichloroisonicotinic acid, two inducers of plant defense responses" **J. of. Biochemistry**, 92, pp 11312-11316.

Edelstein M., Cohen R., Burger Y., Shriber S., Pivonia S. and Shtienberg D. (1999) "Integrated management of sudden wilt in melons, caused by *Monosporascus cannonballus*, using grafting and reduced rates of methyl bromide" **J. of. Plant Disease**, 83, pp 1142-1145.

Eyal H. and Cohen Y. (1986) "Sudden wilt in muskmelon: A continuing challenge" **J. of. Phytoparasitica**, 14, pp 251.

Friis P., Olsen C. and Moller B. L. (1991) "Toxin production in *Pyrenophora teres*, the ascomycete causing the net-spot blotch disease of barely (*Hordeum vulgare* L.)" **J. of. Biol Chem.**, 266, pp 13329-13335.

Garcia-Jimenez J., Velaquez M. T., Jorda C. and Alfaro-Garcia A. (1994) "Acremonium species as the causal agent of muskmelon collapse in Spain" **J. of. Plant Disease**, 78, pp 416-419.

García-Jiménez J., Armengo J., Sales R., Jordá C. and Bruton B. D. (2000) "Fungal pathogens associated with melon collapse in Spain" **J. of. EPPO Bulletin**, 30, pp 169-173.

Getsinger K. D. (1998) "Chemical control research in the corps of engineers" **J. of. Plant Management**, 36, 1, pp 61-64.

Gilbert H. J. (2010) "The biochemistry and structural biology of plant cell wall deconstruction" **J. of. Plant Physiology**, 153, pp 444–455.

Graniti A. (1989) " Host-specific toxins*:* recognition and specificity factors in plant disease", Tottori University Press, Tottori, Japan. In: Ref. 10, pp 143-152.

Harholt J., Suttangkakul A. and Scheller H. V. (2010) "Biosynthesis of pectins" **J. of. Plant Physiology**, 153, pp 384–395.

Hatziloukas E. and Panopoulos N. J. (1992) "Origin and structure and regulation of the *argK* gene encoding the phaseolotoxin-resistant ornithine carbamoyltransferase in

Pseudomonas syringae pv. *phaseolicola* and its functional expression in transgenic tobacco" **J. of. Bacteriology**, 16, pp 335-343.

Hedstrom L. (2002) "Serine protease mechanism and specificity" **J. of. Chemistry**, 102, pp 4501-4523.

Hershenhorn J., Vurro M., Zonno M. C., Stierle A. and Strobel G. (1993) "*Septoria cirsii*, a potential biocontrol agent of Canada thistle and its phytotoxin—beta-nitropropionic acid" **J. of. Plant Science**, 94, pp 227-234.

Holmes G. J. and Stanghellini M. E. (1998) "Monosporascus root rot of melons in Imerial Valley" **J. of. Phytopathology**, 88, pp 121.

Hu X., Bidney D. L., Yalpani N., Duvick J. P., Crasta O., Folkerts O. and Lu G. (2003) "Engineering *Sclerotinia sclerotiorum* resistance in oilseed crops" **J. of. Plant physiology**, 133, pp 170-181.

Hwang S. F., Ahmed H. U., Gossen B. D., Kutcher H. R., Brandt S. A., Strelkov S. E., Chang K. F. and Turnbull G. D. (2009) "Effect of crop rotation on the soil pathogen population dynamics and canola seedling establishment" **J. of. Plant Pathol.**, 8, pp 106-112.

Itoh Y., Kohmoto K., Otani H., Kodama M., Nishimura S., Nakatsuka S. and Goto T. (1989) "Isolation and biological activities of host-specific toxins, ACT-toxins produced by the tangerine pathotype of *Alternaria alternata*" **J. of. Phytopathology**, 55, pp 482.

Jun-Hai N., Heng J., Jian-Mei X., Yang-Dong G. and Qian L. (2010) "RNAi technology extends its reach: Engineering plant resistance against harmful eukaryotes" **J. of. Afr. J. Biotechnol.**, 9, 45, pp 7573-7582.

Karlatti R. S., Abdeen F. M. and Al-Fehaid M. S. (1997) "First report of *Monosporascus cannonballus* in Saudi Arabia" **J. of. Plant Disease**, 81, pp 1215.

Kaschani F., Gu C., van der Hoorn R. A. (2012) "Activity-based protein profiling of infected plants" **J. of. Methods Mol Biol**, 835, pp 47-59.

Katherine A. A. (2009) "Using RNA interference to increase crop yield and decrease pest damage" **J. of. Basic Biotechnology**, 5, pp 7-12.

Kato T., Shiraishi T., Toyoda K., Saitoh K., Satoh Y., Tahara M., Yamada T. and Oku H. (1993) "Inhibition of ATPase activity in pea plasma membranes by fungal suppressors from *Mycosphaerella pinodes* and their peptide moieties" **J. of. Plant Cell Physiology**, 34, 3, pp 439-445.

Keen N. T. (1986) "**Pathogenic strategies of fungi Recognition in Microbe-Plant Symbiotic and Pathogenic Interactions**", Vol. 4, Springer-Verlag, Berlin, pp 171-188.

Keen N. T. (1995) "Pathogen virulence factors - molecolar genetics confuses the issue" **J. of. Phytoparasitica**, 23, pp 281-284.

Kim D. H., Rasmussen S. L. and Stanghellini M. E. (1995) "*Monosporascus cannonballus* root rot of muskmelon: Root infection and symptom development in relation to soil temperature" **J. of. Phytopathology**, 85, pp 1195.

Kolattukudy P. E. (1985) "Enzymatic penetration of the plant cuticule by fungal pathogens" **J. of. Phytopathology**, 23, pp 223-250.

Levings C. S., Rhoads D. M. and Siedow J. N. (1995) "Molecular interactions of *Bipolaris maydis* T-toxin and maize" **J. of. Can Bot**, 73, pp 483-489.

Lopez-Lopez K., Hernandez-Flores J. L., Cruz-Aguilar M. and Alvarez-Morales A. (2004) "In *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*, expression of the *argK* gene, encoding the phaseolotoxin-resistant ornithine carbamoyltransferase, is regulated indirectly by temperature and directly by a precursor resembling carbamoylphosphate" **J. of. Bacteriology**, 186, pp 146-153.

Lorenzo G., Aracri B., Bellincampi D., Caprart C., Devoto A. A., Leckie F., Nuss L., Kalvi G. and Cervone F. (1996) "Una ipotesi di sistema immunitario nelle piante" **J. of. Petria**, 1, pp 105-111.

Lu R., Martin-Hernandez J. R., Peart I. M. and Baulcombe D. C. (2003) "Virus induced gene silencing in plants" **J. of. Methods in Phytobacteriology**, 30, pp 296-303.

Mao Y. B., Cai W., Wang J., Hong G., Tao X., Wang L., Huang Y. and Chen X. (2007) "Silencing a cotton bollworm P450 monooxygenase gene by plant-mediated RNAi impairs larval tolerance of gossypol" **J. of. Nat Biotechnol**, 25, pp 1307-1313.

Maria-Fedatto L., Silva-Stenico M. E., Etchegaray A., Pacheco F. T., Rodrigues J. L. and Tsai S. M. (2006) "Detection and characterization of protease secreted by the plant pathogen *Xylella fastidiosa*" **J. of. Microbiol Research**, 161, 3, pp 263-272.

Marre E., Marre M. T. and Romani G. (1989) "Action of fusicoccin in vivo: physiological and biochemical consequences" **J. of. Phytotoxins and Plant Pathogenesis**, pp 131-141.

Martyn R. D., Lovic B. R., Maddox D. A., Germash A. and Miller M. E. (1994) "First report of Monosporascus root rot/vine decline of watermelon in Tunisia" **J. of. Plant Disease**, 78, pp 1220.

Martyn R. D. and Miller M. E. (1996) "Monosporascus root rot and vine decline: An emerging disease of melons worldwide" **J. of. Plant Disease**, 80, pp 716-725.

Martyn R. D. (2002) "Monosporascus root rot and vine decline of melons" **J. of. The Plant Health Instructor**: DOI: 10.1094/PHI-I-2002-0612-01.

Meehan F. and Murphy H. C. (1946) "A new Helminthosporium blight of oats" **J. of. Science**, 104, pp 413-414.

Mertely J. C., Martyn R. D., Miller M. E. and Bruton B. D. (1991) "Role of *Monosporascus cannonballus* and other fungi in root rot/vine decline disease of muskmelon" **J. of. Plant Disease**, 75, pp 1133-1137.

Mertely J. C., Martyn R. D., Miller M. E. and Bruton B. D. (1993) "An expand host range for muskmelon pathogen *Monosporascus cannonballus*" **J. of. Plant Disease**, 77, pp 667-673.

Meyer W. L., Kuyper L. F., Phelps D. W. and Cordes A. W. (1974) "Structure of the cyclic tetrapeptide tentoxin" **J. of. Chem Soc.**, pp 399-400.

Mittler R., Vanderauwera S., Gollery M. and Van-Breusegem F. (2004) "Reactive oxygen gene network of plants" **J. of. Trends Plant Sci.**, 9, pp 490–498.

Murashige T. and Skoog F. (1962) "A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures" **J. of. Plant Physiology**, 15, pp 473-497.

Nakashima T., Ueno T., Fukami H., Taga T. and Masuda H. (1985) "Isolation and structures of AK-toxin I and II, host-specific phytotoxic metabolites produced by *Alternaria alternata* japanese pear pathotype" **J. of. Agric. Biol. Chem.**, 49, pp 807-815.

Namiki F., Yamamoto M., Nishimura S., Nakatsuka S., Goto T., Kohmoto K. and Otani H. (1986) "Studies on host-specific AF-toxins produced by *Alternaria alternata* strawberry pathotype causing Alternaria black spot of strawberry" **J. of. Phytopathology**, 52, pp 428-436.

Nishimura S. and Scheffer R. P. (1965) "Interactions between *Helminthosporium victoria* spores and oat tissue" **J. of. Phytopathology**, 55, pp 629-634.

Nishimura S., Vance C. P. and Doke N. (1987) "Molecular determinants of plant disease" **J. of. Mol Appl Gen**, 1, pp 561-573.

Nishimura S. and Nakatsuka S. (1989) "**Trends in host-selective toxin research in Japan**" Tottori University Press, Tottori, pp 19-31.

Oku H. (1994), "**Plant pathogenesis and disease control**" Lewis Publishers, Boca Raton ecc, pp 193.

Olivieri F., Eugenia-Zanetti M., Oliva C. R., Covarrubias A. A. and Casalongu C. A. (2002) "Characterization of an extracellular serine protease of *Fusarium eumartii* and its action on pathogenesis related proteins" **J. of. Plant Pathology**, 108, pp 63–72.

Oropeza C., Santamaría J. M. and Ashburner G. R. (1997), "**A model for the pathogenicity of lethal yellowing in coconut palms (*Cocos nucifera*)**" Natural Resources Institute, Chatham, UK, pp 109-115.

Osbourn A. E. (2001), "**Tox-boxes, fungal secondary metabolites and plant disease**", Vol. 98, Proceedings of the national Academy of Science USA. 25, pp 14187-14188.

Park S. H., Stierle A. and Strobel G. A. (1994) "Metabolism of maculosin, a host-specific phytotoxin produced by *Alternaria alternata* on spotted knapweed (*Centaurea maculosa*)" **J. of. Phytochemistry**, 35, pp 101-106.

Pitkin J. W., Panaccione D. G. and Walton J. D. (1996) "A putative cyclic peptide efflux pump encoded by *TOXA* gene of the plant-pathogenic fungus *Cochliobolus carbonum*" **J. of. Microbiology**, 142, pp 1557-1565.

Pivonia S., Cohen R., Kafkafi U., BenZeev I. S. and Katan J. (1997) "Sudden wilt of melons in Suutherns Israel: Fungal agents and relationship with plant development" **J. of. Plant Disease**, 81, pp 1264-1268.

Pollack F. G. and Uecker F. A. (1974) "*Monosporascus cannonballus* an unusual ascomycete in cantaloupe roots" **J. of. Mycologia**, 66, pp 346-349.

Pringle R. B. and Scheffer R. P. (1964) "Host-specific plant toxins" **J. of. Plant Pathol.**, 2, pp 133-156.

Rajendra B. and Jonathan D. G. (2009) "Role of plant hormones in plant defence responses" **J. of. Plant Mol. Biol.**, 69, pp 473–488.

Rajkishor G., Nand K. S., Shivesh S., Keshav P. S. and Vasudha S. (2011) "Role of MicroRNA in Crop Plant Improvement" **J. of. Plant Biotechnology**, 1, 2, pp 14-24.

Rawlings N. D., Tolle D. P. and Barrett A. J. (2002) "MEROPS: the peptidase database" **J. of. Nucleic Acids Research**, pp 160-164.

Reuveni R., Krikun J. and Shani U. (1983) "The role of *Monosporascus eutypoides* in a collapse of melon plants in an arid area of Israel" **J. of. Phytopathology**, 73, pp 1223-1226.

Robinson M. M., Griffith M., Pauls K. P. and Glick B. R. (2001) "Dual role for ethylene in susceptibility of tomato to Verticillium wilt" **J. of. Phytopathololology**, 149, pp 385-388.

Rocha O., Ansari K. and Doohan F. M. (2005) "ffects of trichothecene mycotoxins on eukaryotic cells: a review" **J. of. Food Addit. Contam.**, 22, pp 369-378.

Ruiqian L., Qian Y., Thanaboripat D. and Thansukon P. (2007) "Biocontrol of *Aspergillus flavus* and aflatoxin production" **J. of. Food Addit. Contam.**, pp 1-9.

Sarpeleh A., Wallwork H., Catcheside D., Tate M. and Able A. (2007) "Proteinaceous metabolites from *Pyrenophora teres* contribute to symptom development of barley net blotch" **J. of. Cell biol. Biochem.**, 97, pp 907-915.

Sarpeleh A. (2008) "The role of *Monosporascus cannonballus* in melon collapse in Iran" **J. of. Australasian Plant Disease Notes**, 3, pp 162-164.

Sarpeleh A., Cheraghali V. and Razavi M. (2012) "Detection of *Monosporascus cannonballus* from melon plants using PCR" **J. of. Crop Protection**, 1, 4, pp 349-359.

Savidor A., Teper D., Gartemann K. H., Eichenlaub R., Chalupowicz L., Manulis-Sasson S., Barash I., Tews H., Mayer K., Giannone R. J., Hettich R. L. and Sessa G. (2012) "The *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis-tomato* interactome reveals the perception of pathogen by the host and suggests mechanisms of infection" **J. of. Proteome Research**, 11, 2, pp 736-750.

Scheffer R. P. and Livingston R. S. (1984) "Host-selective toxins and their role in plant diseases" **J. of. Science**, 223, pp 17-21.

Scheible W. R., Fry B., Kochevenko A., Schindelasch D., Zimmerli L., Somerville S., Loria R. and Somerville C. R. (2003) "An Arabidopsis mutant resistant to thaxtomin A, a cellulose synthesis inhibitor from Streptomyces species" **J. of. Plant Cell**, 15, pp 1781-1794.

Scheller H. V. and Ulvskov P. (2010) "Hemicelluloses" **J. of. Plant Biology**, 61, pp 263–289.

Scholte K. (1992) "Effect of crop rotation on the incidence of soil-borne fungal diseases of potato" **J. of. Plant Pathol.**, 98, pp 93-101.

Singh J., Quereshi S., Banerjee N. and Kumar A. (2010) "Production and extraction of phytotoxins from *Colletotrichum dematium* FGCC# 20 effective against *Parthenium hysterophorus* L" **J. of. Braz. Arch. Biol. Technol.**, 53, 3, pp 669-678.

Singleton V. L., Bohonos N. and Ullstrup A. J. (1958) "Decumbin, a new compound from a species of Penicillium" **J. of. Nature**, 181, pp 1072-1073.

Slavov S. (2005) "Phytotoxin and invitro screening for improved disease resistant plants" **J. of. Biotechnology**, 19, pp 48-55.

Stanghellini M. E., Kim D. H and Rasussen S. L. (1996) "Ascospores of *Monosporascus cannonballus*: germination and distribution in cultivated and desert soils in Arizona" **J. of. Ecology and Epidemiology**, 5, pp 509-514.

Steinkamp M. P., Martin S. S., Hoefert L. L. and Ruppell E. G. (1981) "Ultrastructure of lesions produced in leaves of Beta vulgaris by cercosporin, a toxin from *Cercospora beticola*" **J. of. Phytopathology**, 71, pp 1272-1281.

Stork I., Gartemann K. H., Burger A. and Eichenlaub R. (2008) "A family of serine proteases of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*: chpC plays a role in colonization of the host plant tomato" **J. of. Mol. Plant. Pathol.**, 9, 5, pp 599-608.

Strange R. N. (2006) "Phytotoxins produced by microbial plant pathogens" **J. of. Natural Product**, 27, pp 127-144.

Sugawara F., Strobel G., Fisher L. E., Van-Duyne G. D. and Clardy J. (1985) "Bipolaroxin, a selective phytotoxin produced by *Bipolaris cynodontis*" **J. of. Chemistry**, 82, pp 8291-8294.

Sugawara F. and Strobel G. (1986) "Zinniol, a phytotoxin, is produced by *Phoma macdonaldii*" **J. of. Plant Science**, 43, pp 19-23.

Surico G. (1996) "Fitormoni e malattie batteriche iperplastiche da *Pseudomonas savastanoi* e *Agrobacterium tumefaciens*" **J. of. Petria**, 6, pp 84-100.

Templeton G. E. (1972) "Alternaria toxin related to pathogenesis in plants" **J. of. Microbial Toxins**, 8, pp 160-192.

Thomas A. Z., Donald L. H. and Claude E. (1996) "**Compendium of cucurbit diseases**" The American Phytopathological Society Press Saint Paul, Minnesota, pp 1-87.

Tian M., Huitema E., Da-Cunha L., Torto-Alalibo T. and Kamoun S. (2005) "A Kazal-like extracellular serine protease inhibitor from *Phytophthora infestans* targets the tomato pathogenesis-related protease P69B" **J. of. Biol. Chem.**, 279, 25, pp 26370-26377.

Tietjen K. G., Hammer D. and Matern U. (1985) "Determination of toxin distribution in Alternaria leaf spot diseased tissue by radioimmunoassay" **J. of. Plant Pathol.**, 26, pp 241-257.

Tipton C. L., Paulsen P. V. and Betts R. E. (1977) "Effects of ophiobolin A on ion leakage and hexose uptake by maize roots" **J. of. Plant Physiology**, 59, pp 907-910.

Troutman J. L. and Matejka J. C. (1970) "Three fungi associated with cantaloupe roots in Arizona" **J. of. Phytopathology**, 60, pp 1317.

Tsay J. G. and Tung B. K. (1995) "The occurrence of Monosporascus root rot/vine decline of muskmelon in Taiwan" **J. of. Plant Pathology Bulletin**, 4, pp 25-29.

Turner N. C. and Graniti A. (1969) "Fusicoccin: a fungal toxin that open stomata" **J. of. Nature**, 223, pp 1070-1071.

Uematsu S., Onogi S. and Watanabe T. (1985) "Pathogenicity of *Monosporascus cannonballus* Pollack and Uecker in relation to melon root rot in Japan" **J. of. Ann Phytopathol Soc Jpn**, 51, pp 272-276.

Vaucheret H. (2006) "Post-transcriptional small RNA pathways in plants: mechanisms and regulations”" **J. of. Genes and Development**, 20, pp 759-771.

Vaughn K. C. and Duke S. O. (1981) "Tentoxin-induced loss of plastidic polyphenol oxidase" **J. of. Plant Physiology**, 53, pp 421-428.

Walton J. D., Earle E. D. and Gibson B. W. (1982) "Purification and structure of the host-specific toxin from *Helminthosporium carbonum* race 1" **J. of. Biochemistry Biophysyology**, 107, pp 785-794.

Walton J. D. (1996) "Host-selective toxins: agents of compatibility" **J. of. Plant Cell**, 8, pp 1723-1733.

Watanabe T. (1979) "*Monosporascus cannonballus*, an ascomycete from wilted melon roots described in Japan" **J. of. Mycology**, 20, pp 312-316.

Waugh M. M., Kim D. H., Ferrin D. M. and Stanghellini M. E. (2003) "Reproductive potential of *Monosporascus cannonballus*" **J. of. Plant Disease**, 87, pp 45-50.

Weiss U., Merlini L. and Nasini G. (1987) "Naturally occurring perylenquinones" **J. of. Natural products**, 52, pp 1-71.

Wolf D. and Miller M. (1998) "Tolerance to Monosporascus root rot and vine decline in melon (*Cucumis melo* L.) germplasm" **J. of. Hortscience**, 33, pp 287-290.

Yamada T. (1993) "The role of auxins in plant disease development" **J. of. Phytopathology**, 31, pp 253-273.

Yoder O. C. (1973) "A selective toxin produced by *Phyllosticta maydis*" **J. of. Phytopathology**, 63, pp 1361-1366.

Yoder O. C. and Turgeon B. G. (1994) "Molecular determinants of the plant/fungus interaction" **J. of. Phytopathology**, pp 23-32.

Zhang l., Xu J. L. and Birch R. G. (1999) "Engineered detoxification confers resistance against a pathogenic bacterium" **J. of. National Biotechnology**, 17, pp 1021-1024.

Zhang L. and Birch R. G. (1997) "The gene for albicidin detoxification from *Pantoea dispersa* encodes an esterase and attenuates pathogenicity of *Xanthomonas albilineans* to sugarcane" **J. of. Microbiology**, 22, pp 132-136.

Zhou J., Lin C. Z., Zheng X. Z., Lin X. J., Sang W. J., Wang S. H., Wang Z. H., Ebbole D. and Lu G. D. (2009) "Functional analysis of an alpha-1,2-mannosidase from *Magnaporthe oryzae*" **J. of. Current Genetics**, 55, 4, pp 485-496.

Zhu J., Oger P. M., Schrammeijer B., Hooykaas P. J. J., Farrand S. K. and Winans S. C. (2000) "The bases of crown gall tumorigenesis" **J. of. Bacteriology**, 182, pp 3885-3895.

Abstract:

Root rot and Vine decline disease of melon plants induced by *Monosporascus cannonballus.*

secreted metabolites (bottom and top of 10 kDa) of *M. cannonballus* were extracted from liquid culture media (Czapeck's) of the fungus and purified using high voltage paper electrophoresis and sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis, identified sequence of the bands with relative molecular mass of bigger than 10 kDa (26, 27, and 57) were determined via mass spectrometry. The smaller bands had the same sequence information and similar to serine protease from *Lecanicillium psalliotae* are most likely the isozymes of the same protein. Meanwhile, the 57 kDa band was identified as α-1,2-mannosidase similar to *Phytophthora infestans* (*T30-4*). Fungal serine proteases hydrolyze plant cuticule, while the mechanism of α-1,2-mannosidase has been remained elusive in pathogenisity. Metabolites under 10 kDa reacted positive with ninhydrin in electrophotogram. Due to the relative mobility on paper ($R_m = 1$) and biological activity such as water-soaking, it seems that this compound belongs to marasmines (a group of phytotoxic). Both small and big fractions demonstrated to be phytotoxic to melon leaves. This is the first report of phytotoxic compounds isolated from *M. cannonballus* contributing to disease induction in melon plants.

In order to obtain tolerant melon lines via somaclonal variation, the explants were grown in MS medium with different concentrations of BA and 2,4-D hormones and different concentrations of fungal secretome for 7 weeks. The results were indicative of producing tolerant lines to *M. cannonballus* in the availability of 0.7 mg of the secretome.

Key words: Cucmis melo, melon collapse, *Monosporascus cannonballus*, fungal phytotoxin, tissue culture melon

Shahrood University of Technology

Shahrood University of Technology

Faculty of Agriculture

The role of *Monosporascus cannonballus* secretomes in melon root rot and vine decline

Supervisor

Dr. Naser Farrokhi

Dr. Abolfazl Sarpeleh

Advisor

Dr. Shahrokh Gharanjik

Dr. Mojtaba Mamarabadi

Behnoush Hosseini

February, 2014